

A CD8+ T-sejtek új homing markereinek vizsgálata experimentálisan indukált egér és humán akut graft versus host betegségben

Doktori értekezés

Lupsa Nikolett

Semmelweis Egyetem
Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Pós Zoltán, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Jakus Zoltán Péter, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Koncz Gábor, Ph.D., tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kárpáti Sarolta, az MTA doktora,
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora,
egyetemi tanár
Dr. Erdélyi Dániel János, Ph.D.,
egyetemi adjunktus

Budapest
2019.

TARTALOM

1. Rövidítések	5
2. Bevezetés	13
2.1 A hematopoetikus őssejt-transzplantáció.....	13
2.1.1 Az őssejtek forrása.....	14
2.1.2 Az őssejt-transzplantáció típusai.....	15
2.1.3 Az allogén transzplantáció.....	20
2.1.3.1 A HLA gének jelentősége a transzplantációban	21
2.1.3.2 A transzplantáció előkészítése - a kondicionálás	23
2.1.3.3 A transzplantáció.....	26
2.1.3.4 A transzplantáció kiterjesztése - a donor limfocita infúzió	26
2.1.3.5 Az aHSCT szövődményei.....	27
2.2 A graft versus host betegség	30
2.2.1 Az akut graft-versus-host betegség.....	32
2.2.1.1 Rizikófaktorok.....	36
2.2.1.2 Klinikai manifesztáció	38
2.2.1.3 Staging és Grading.....	39
2.2.1.4 Profilaxis	41
2.2.1.5 Terápia.....	45
2.3 Fejlesztés alatt álló és vizsgálati szakban lévő terápiák	47
2.3.1 NK-sejt adoptív transzferes immunterápia	47
2.3.2 Anti-tumor vakcináció	47
2.3.3 Monoklonális antitest terápia	48
2.3.4 Regulatórikus T-sejt infúzió	49
2.3.5 A graft $\alpha\beta$ T-sejt depléciója	50
2.3.6 Allo-reaktív T-sejtek szelektív depléciója	50
2.3.7 Anti-virális citotoxikus sejtvonalak használata	51
2.3.8 Kiméra antigén receptorokat hordozó T-sejtek	51
2.4 Az egér experimentális aGvHD modellek jelentősége a kutatásában.....	52
2.4.1 Az aGvHD egérmodelljeinek erősségei és korlátai	53
2.4.2 MHC mismatch-alapú aGvHD egérmodellek.....	55
2.4.3 miHA mismatch modellek	57
2.4.4 Xenogén modellek.....	57
2.4.5 Antigén-specifikus transzgén TCR modellek.....	58

2.5	A CD8+ citotoxikus T-sejtek az aGvHD kórfolyamatának kitüntetett effektor sejtjei	60
2.5.1	CD8+ T-sejtek homingja az a GVHD patológiájában.....	62
2.5.1.1	A bőr irányú homing.....	64
2.5.1.2	Bél irányú homing	65
2.5.1.3	T sejt homing a kután és gasztrointesztinális aGvHD során	66
3.	Célkitűzések	69
4.	Anyagok és módszerek.....	71
4.1	Egér aGvHD modell.....	71
4.1.1	Felhasznált egértörzsek	71
4.1.2	OT-I → OVA akut GvHD modell	72
4.1.3	Hisztológia	73
4.1.4	UBC-GFP/OT-I CD8+ T-sejtek követése az aGvHD által érintett szövetekben... ..	73
4.1.5	CD45.1/OT-I CD8+ T-sejtek kinyerése automatizált szöveti disszociációval és sejt szortolással	74
4.1.6	ELISA	74
4.1.7	TREC assay	75
4.1.8	Áramlási citometria	76
4.1.9	Génexpressziós vizsgálat	76
4.1.10	Statistikai analízis	77
4.2	CD8+ T-sejt homing markerek vizsgálata	77
4.2.1	Szövetminták	77
4.2.2	Vérminták	77
4.2.3	PBMC izolálás.....	78
4.2.4	FACS szortolás.....	78
4.2.5	Mikroarray génexpressziós vizsgálat	79
4.2.6	Q-PCR.....	80
4.2.7	Áramlási citometria	80
4.2.8	MACS szortolás	80
4.2.9	Immuncitokémia.....	81
4.2.10	Immunhisztokémia	81
4.2.11	GPI horgony emésztés	81
4.2.12	1,25-dihydroxivitamin D3 és retinsav kezelés	82
4.2.13	CD8+ T-sejt és bél organoid/bőr explantátum ko-kultúrák.....	82
4.2.14	PI-16 Pulldown assay, és a lekötött proteázok azonosítása	83
4.2.15	Proteáz inhibitor assay	85

4.2.16 Statisztikai analízis	85
5. Eredmények	86
5.1 Act-mOVA/OT-I akut GvHD egérmodell felállítása után és bél-irányú homingot folytató CD8+ T-sejtek összehasonlító vizsgálatára	86
5.1.1 Az Act-mOVA/OT-I modell munkakoncepciója	86
5.1.1.1 Az Act-mOVA/OT-I modellben CD8+T-sejt függő, letális, aGvHD-szerű kórfolyamat alakul ki	87
5.1.1.2 Az aGvHD-szerű tünetek a graft CD8+ T-sejteknek a célszervekben való feldúsulásával egyidejűleg jelentkeznek.	89
5.1.1.3 Sejtkövetés; A CD8+ T-sejt akkumuláció a célszervekben a donor T-sejt aktivitás következménye	90
5.1.1.4 Hisztológia: A CD8+ OT-I→Act-mOVA modell érintett szerveiben az aGvHD patológiájának minden aspektusa megfigyelhető	91
5.1.2 Act-mOVA/OT-I modell felhasználása az aGvHD célszerveibe vándorló CD8+ T- sejtek összehasonlító vizsgálatára	94
5.1.2.1 A CD8+ CD45.1 OT-I→Act-mOVA modell alkalmas a donor–eredetű, miHA- specifikus CD8+ T-sejtek intakt és nagy tisztaságú visszanyerésére az aGvHD-s célszervekből.	94
5.1.2.2 Az aGvHD által érintett célszervekből származó CD8+ T-sejtek klonális expanszió átesett, teljes értékű effektor sejtek	95
5.1.2.3 Transzkriptom analízis: A transzplantált CD8 + T-sejtek transzkriptom profilja megerősíti a naiv/effektor átmenetet, ugyanakkor kevés különbséget tár fel az aGvHD különböző célszerveibe infiltráló CD8 + Teff-sejtek között	98
5.2 A CD8+ T-sejtek bél és bőr specifikus homing biomarkereinek azonosítása humán aGvHD-ban	101
5.2.1 Microarray szűrővizsgálat, elsődleges eredmények és validálásuk	102
5.2.1.1 A bőr irányú homingra programozott CD8+ T-sejtek a PI16 mRNS-t fejeznek ki humán aGvHD-ban	102
5.2.1.2 A PI16 emelkedett expressziója a bőr homingot mutató CD8+ T-sejtek sajátossága és független az aGvHD szervi érintettségétől.	104
5.2.1.3 A PI16 fehérje társulása a bőr homingot mutató CD8+ T-sejt szubpopulációval egészségben és betegségben	107
5.2.2 A PI16, mint a bőrbe vándorló CD8+ T-sejt szubpopuláció jellemző markerének validálása egészséges mintákon	108
5.2.2.1 A PI16 kizárólagos jellegzetessége a nem naiv, bőrbe vándorló T-sejteknek, mely a bőrbe lépést követően is stabil marad	108
5.2.2.2 A PI16 intracelluláris lokalizációja a bőr homingot mutató CD8+ T-sejtek membránjára korlátozott, és kikötése GPI-horgonnyal történik	112
5.2.2.3 A PI16 szabályozása a bőrbe vándorló CD8+ T-sejtekben	114

5.2.2.3.1 A PI16 szabályozása független a CLA-étól és az egyéb ismert T-sejt homing markerekeitől	114
5.2.2.3.2 A PI16 aktiváció-függő eltűnése a citotoxikus effektor sejtekről gyors, szorosan kontrollált, RNS szinten-szabályozott folyamat.....	116
5.2.2.4 A PI16 funkciója a bőrbe vándorló T-sejteken: a PI16 a katepszin K gyulladáshoz proteáz szelektív, részleges inhibítora.....	119
6. Megbeszélés	122
6.1 Act-mOVA aGvHD modell.....	122
6.2 A CD8+ T-sejtek homing markereinek vizsgálata humán mintákon, aGvHDs betegekben	126
7. Következtetések	131
8. Összefoglalás	132
9. Summary	133
10. Irodalomjegyzék	134
11. Saját publikációk jegyzéke	148
11.1 Az értekezéshez felhasznált közlemények listája	148
11.2 Az értekezéshez fel nem használt közlemények listája	148
12. Köszönetnyilvánítás.....	149

1. RÖVIDÍTÉSEK

A 83-01:	Egy potens, aktivin receptor-szerű kinázokat (ALK) gátló inhibitor
ACD-A:	Anticoagulant Citrate Dextrose-A Solution /Antikoaguláns citrát dextróz-A oldat
Act-mOVA:	Transzgénikus egér törzs, amely béta aktin promóter szabályozása alatt minden sejt plazmamembránján kifejezi a csirke ovalbumint
aGvHD:	Acute graft-versus-host disease /Akut graft versus host betegség
aHSCT:	Allogeneic hemopoietic stem cell transplantation /Allogén hematopoetikus vérképző őssejt átültetés
ALAT:	Alanine transaminase /Alanin transzamináz
ALL:	Acute lymphoid leukemia /Akut limfoid leukémia
ALP:	Alkaline phosphatase /Alkalikus foszfatáz
AML:	Acute myeloid leukemia /Akut mieloid leukémia
APC:	Allophycocyanin/Allofikocianin
APC:	Antigen-presenting cell /Antigén prezentáló sejt
BCR-ABL:	Breakpoint cluster region protein-Abelson tyrosine-protein kinase fusion protein/fúziós protein
CARs:	Chimeric antigen receptors /Kiméra antigén receptorok
CCNA1:	Cyclin A1 /Ciklin A1
CCNB1:	Cyclin B1/ Ciklin B1
CCNB2:	Cyclin B2/ Ciklin B2
CCNE1:	Cyclin E1/ Ciklin E1
CCNG2:	Cyclin G2/ Ciklin G2
CCR10:	CC-Chemokine receptor type 10 /CC-kemokin receptor 10-es típus
CCR4:	CC-Chemokine receptor type 4 /CC-kemokin receptor 4-es típus

CCR8:	CC-Chemokine receptor type 8 /CC-kemokin receptor 8-as típus
CD127:	Cluster of differentiation 127
CD14:	Cluster of differentiation 14
CD25:	Cluster of differentiation 25
CD3:	Cluster of differentiation 3
CD33:	Cluster of differentiation 33
CD45RO:	Cluster of differentiation 45RO isotype
CD56:	Cluster of differentiation 56
CD59:	Cluster of differentiation 59
CLA:	Cutaneous lymphocyte-associated antigen /Kután limfocita - asszociált antigén
CML:	Chronic myelogenous leukemia /Krónikus mieloid leukémia
CMV:	Cytomegalovirus /Cytomegalovírus
CTL:	Cytotoxic T lymphocyte /Citotoxikus T-sejt
CTLA-4:	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 /Citotoxikus T- limfocita-asszociált antigén-4
Cy3:	Cyanine dye 3/Cianin festék 3
DAB oldat:	Diaminobenzidine solution / Diaminobenzidin oldat
DAPI:	4',6-diamidino-2-phenylindole/4',6-diamidino-2-fenilindol
DC	Dendritic cell /Dendritikus-sejt
DCLRE1c:	DNA Cross-Link Repair 1C
DEG:	Differentially expressed gene /Eltérően expresszálódó gén
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium /Dulbecco módosított Eagle médiuma

DMSO:	Dimethyl sulfoxide /Dimetil-szulfoxid
DNAPKCS:	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit/DNS-dependens protein kináz katalitikus alegysége
EBV:	Epstein-Barr virus / Epstein-Barr vírus
ECP	Extracorporalis photopheresis /Extracorporalis fotoferézis
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic acid /Etilén-diamin-tetraecetsav
EGF:	Epidermal growth factor /Epidermális növekedési faktor
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent assay/ Enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat
FACS:	Flow cytometry /Áramlási citometria
FasL:	Fas ligand (CD95L)
FBS:	Fetal bovine serum /Magzati szarvasmarha szérum
FDR:	False discovery rate /Fals pozitív felfedezések aránya
FITC:	Fluorescein isothiocyanate /Fluoreszcein-izotiocianát
FucT-VII	Glycosyltransferase α 1,3-fucosyl transferase-VII /Glikoziktranszferáz α 1,3-fukoziltranszferáz-VII
G-CSF:	Granulocyte colony-stimulating factor /Granulocita kolónia-stimuláló faktor
GFP:	Green fluorescent protein /Zöld fluoreszcens fehérje
GI:	Gastrointestinal /Gasztrointesztinális
Glutamax:	200 mM L-alanil-L-glutamin dipeptid 0,85% NaCl oldatban
GMP:	Good Manufacturing Practice /Jó Gyártási Gyakorlat
GPI:	Glycosylphosphatidylinositol /Glikozilfoszfatidilinozitol
GSEA:	Gene set enrichment analysis /Génkészlet-gazdagítási elemzés
GvHD:	Graft versus host disease /Graft versus host betegség

GvL:	Graft versus leukemia (reaction) /Graft versus leukémia (hatás)
Gy:	Gray
HBSS w/o:	Hanks' Balanced Salt Solution without magnesium and calcium
HBV:	Hepatitis B virus /Hepatitis B vírus
HE:	Hematoxylin-eosin staining /Hematoxilin-eozin festés
HEPES:	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid / 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav
HEV:	High endothelial venule /Magas endoteliális venulák
HLA:	Human leukocyte antigen /Humán leukocita-antigén
HSC:	Hemopoietic stem cell /Vérképző őssejt
HSCT:	Hemopoietic stem cell transplantation /Vérképző őssejt átültetés
HSV:	Herpes simplex virus /Herpes simplex vírus
HUGO:	Human Genome Organisation
HvG	Host versus graft reaction (graft rejection) / Host versus graft reakció
H-Y:	Male tissue specific antigen /Férfi szövet specifikus antigén
IBMTR	International Bone Marrow Transplant Registry/Nemzetközi Csontvelő-Átültetési Regiszter
ICAM-1:	Intercellular Adhesion Molecule 1 (CD54) /Intercelluláris adhéziós molekula 1
IFN- γ :	Interferon-gamma
IHC:	Immunohistochemistry /Immunohisztokémia
IL-2:	Interleukin-2
IL-2R α :	Interleukin-2 receptor alpha chain (CD25) /Interleukin 2 receptor alfa lánc (CD25)

IL2R β :	Interleukin-2 receptor beta chain (CD122) /Interleukin 2 receptor béta lánc (CD122)
IL-8:	Interleukin-8
ILC:	Innate lymphoid cell
IRB:	Internal Review Board /Belső Kutatásetikai Bizottság
ISC:	Intestinal Stem Cells /Bél őssejtek
ITG β 7:	Integrin beta-7 /Integrin béta 7
IVC:	Individually Ventilated Cages /Egyéni szellőzésű ketrecek
JAK:	Janus kinase /Janus-kináz
K14:	Cytokeratin 14 promoter /Citokeratin 14 promóter
LCMV:	Lymphocytic choriomeningitis /Limfocitás choriomeningitis vírus
LFA1	Lymphocyte function-associated antigen 1/ Limfocita funkció asszociált antigén 1
LIG4:	DNA ligase 4 /DNS ligáz 4
MAC:	Myeloablative conditioning /Mieloablatív kondicionálás
MACS:	Magnetic cell separation /Mágneses sejt szeparálás
MadCAM1:	Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1 /Mukozális sejtadhéziós molekula
Matrigel:	Engelbreth-Holm-Swarm egér szarkóma sejtek által szekretált extracelluláris mátrix-protein keverék kereskedelmi neve
Mb:	Megabase /Megabázis
MDS:	Myelodysplastic syndrome /Mielodiszplázia
MHC:	Major histocompatibility complex /Fő hisztokompatibilitási komplex
miHA:	Minor histocompatibility antigen /Minor hisztokompatibilitási antigén

MM:	Multiple myeloma /Mieloma multiplex
MMF:	Mycophenolic acid /Mikofenolát-mofetil
MMP-2:	Matrix metalloproteinase-2 /Mátrix metalloproteináz 2
MPN:	Myeloproliferative neoplasms /Mieloproliferatív neopláziák
MSCs:	Mesenchymal stem cell /Mezenchimális őssejt
MUD:	MHC-matched unrelated donor /MHC egyező, nem rokon donor
NES:	Normalized enrichment score
NFAT:	Nuclear factor of activated T-cell /Aktivált T-sejt nukleáris faktor
NHEJ1:	Non-Homologous End Joining Factor 1 /Nem homológ vég összekapcsoló faktor 1
NHL:	non-Hodgkin-lymphoma
NMC:	Non-myeloablative conditioning /Nem-mieloablatív kondicionálás
NMDP:	National Marrow Donor Program /Nemzeti csontvelő donor program
NMR	Non relapse mortality /Nem relapszus okozta mortalitás
NOD-SCID:	Non-obese diabetic-severe combined immunodeficient (mice) /Nem obéz diabetikus-súlyos kombinált immundefektus (egér)
NSG:	NOD SCID (IL-2R) gamma (deficient) mouse /NOD SCID (IL-2R) gamma (hiányos) egér
OKT3:	Muromonab /Anti-CD3 monoklonális ellenanyag
OT-I:	CD8+ T-sejtjein kizárólag előre átrendezett, csirke ovalbumin- specifikus T-sejt receptort kifejező, MHC I-gyel reaktív transzgén TCR-t hordozó egértörzs
OT-II:	CD4+ T-sejtjein kizárólag előre átrendezett, csirke ovalbumin- specifikus T-sejt receptort kifejező, MHC II-vel reaktív transzgén TCR-t hordozó egértörzs

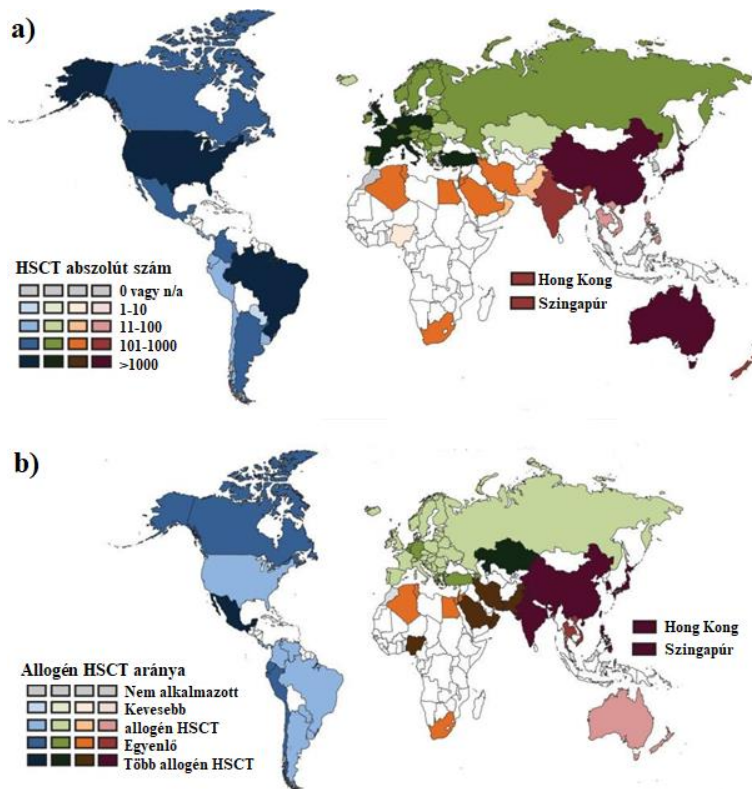
PBMC:	Peripheral blood mononuclear cell /Perifériás vér mononukleáris sejtek
PBS:	Phosphate buffered saline /Foszfát pufferelt fiziológias sóoldat
PCA:	Principal component analysis /Főkomponens-analízis
PDGF:	Platelet-derived growth factor /Vérlemezkből származó növekedési faktor
PE:	Phycoerythrin /Fikoeritrin
PERP:	Tetrapan protein, p53 transcriptional target proapoptotic gene /Tetrapán fehérje, p53 transzkripció célpont proapoptotikus gén
PI16:	Peptidase inhibitor 16 /Peptidáz inhibitor 16
PI-PLC:	Phosphoinositide phospholipase C /Foszfoinozítid foszfolipáz C
POLA1:	DNA Polymerase Alpha 1 /DNS polimeráz alfa 1
POLG2:	DNA Polymerase Gamma 2 /DNS polimeráz gamma2
POLM:	DNA polymerase mu /DNS polimeráz mü
Q-PCR:	Quantitative polymerase chain reaction /Kvantitatív polimeráz láncreakció
RAG 1:	Recombination activating gene 1 /Rekombinációs aktiváló gén 1
RAG2:	Recombination activating gene 2 /Rekombinációs aktiváló gén 2
RIC:	Reduced intensity conditioning /Csökkentett erősségű kondicionálás
RSV:	Respiratory Syncytial Virus /respiratorikus szinciciális vírus
SB 202190:	4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole
scFV:	Single-chain variable fragment /Egyláncú variábilis fragmens
SCID	Severe combined immunodeficiency /Súlyos kombinált immundefektus

SDF-1:	Stromal cell-derived factor 1
sLeX	Sialyl-Lewis X /Szialil-LewisX
SPF:	Specific-pathogen-free /Specifikus patogénektől mentes
TBI:	Total body irradiation /Teljestest-besugárzás
TCR	T cell receptor /T-sejt receptor
Teff:	Effector T cell /Effektor T-sejt
Th:	Helper T cell /Helper T-sejt
TNFR1:	Tumor necrosis factor receptor 1 /Tumor nekrosis faktor receptor 1
TREC:	T cell receptor excision circles /T-sejt receptor excíziós körök
Treg:	Regulatory T cell /Regulatórikus T-sejt
TS1:	CD4+ T-sejtjein kizárólag előre átredezett, a H1N1 A/PR/8/34 influenza vírustörzs hemagglutinin antigénjének S1 determinánsára specifikus, MHC II-vel reaktív transzgén TCR-t hordozó egértörzs
TUKEB:	Scientific and Research Ethics Committee /Tudományos és Kutatásetikai Bizottság
UBC:	Human ubiquitin C promoter /Humán ubikvitin C promóter
VCAM1	Vascular cell adhesion protein 1 /Vaszkuláris sejt adhézión fehérje 1
VLA4	Very late antigen-4 /Integrin $\alpha 4\beta 1$
WHO:	World Health Organization /Egészségügyi Világszervezet
Wnt3A:	Wingless-Type Mouse Mammary Tumor Virus Integration Site Family Member 3A / Szárnyatlan típusú Egér Emlővírus Beépülési Hely Család 3A tagja
γ GT:	Serum gamma glutamyl transferase /Szérum gamma-glutamil-transzferáz

2. BEVEZETÉS

2.1 A hematopoetikus őssejt-transzplantáció

A hematopoetikus őssejtek (HSC)-transzplantációja (HSCT) a standard orvosi ellátás részét képezi számos vérképzőrendszeri rosszindulatú daganat, szolid tumor, öröklött immunhiányos állapot, sőt egyes anyagcsere- és raktározási megbetegedések kezelésére (2). A HSCT talán az egyik legegységesebb terápiás eljárás az orvostudományban, melynek lehetősége először a II. világháborúban sugárfertőzést szenvedett betegek kezelése során merült fel. A HSCT során a betegek intravénás infúzióval keresztül hematopoetikus progenitor sejteket kapnak vagy önmaguktól (autológ) vagy egy másik egészséges személytől (allogén, ritkán szingén), melynek forrása igen változatos lehet (perifériás vér, csontvelő, köldökzsinór vér), azzal a céllal, hogy a sérült, vagy nem működő vérképzés illetve immunrendszer funkcionalitása helyreálljon. Az elmúlt két évtizedben az elvégzett HSCT-k száma világszerte emelkedést mutat, melyhez nagyban hozzájárultak mind a technológia folyamatos továbbfejlesztése, mind az alap kutatások hozta fundamentális felfedezések. Egy tanulmány szerint, a világ 77 országában 1566 transzplantációs centrum jelentése alapján évente összesen 68.146 HSCT-t hajtanak végre, melyből 47%, azaz 31.926 volt allogén, míg 53%, tehát 36.220 volt autológ átültetés (3).



1. Ábra: a) Az őssejt-transzplantációk abszolút számai és eloszlása a világon.

b) Az allogén- és autológ átültetések eloszlása országoként.

2.1.1 Az őssejtek forrása

A HSCT-re használt őssejtek származhatnak a csontvelőből, illetve előkezelés után perifériás vérből vagy akár köldökszinór vérből is. Az őssejt-transzplantáció hajnalán az autológ illetve az allogén átültetések (ezek részletes kifejtését lásd későbbi fejezetben) egyik leggyakrabban használt őssejt-forrása a csontvelő volt. Sajnos a gyűjtési eljárásához steril klinikai körülmények szükségesek, a folyamat a donor számára erősen invazív, komoly fájdalommal járó beavatkozás, ami limitálta az önkéntes donorok hajlandóságát.

Többek között emiatt mára minden transzplantációs típus esetén a perifériás vér, mint őssejtforrás szinte teljesen kiszorította a csontvelő használatát (4). A perifériás véren alapuló HSCT, melyet először 1993-ban alkalmaztak, növelni tudta a donorok számát, hiszen ezen eljárás során nincs szükség műtéti körülményekre, csupán egy előkezelésre és az azt követő vérvételre, így ez sokkal kisebb megterhelést jelent az önkéntesek számára, mint a csontvelő biopszia (5). Az előkezelés vagy mobilizálás során a donor az őssejttermelés fokozásának elősegítésére intravénásan adott rekombináns granulocita-kolónia stimuláló faktor (G-CSF) kezelésben részesül. Ezt követően a keringésben nagy számban megjelenő őssejteket leukoferezissel gyűjtik be. A folyamatot egy aferezis gép végzi, amely a vérsejtek és plazma komponensek szeparálását végzi, lehetőséget teremtve a HSC-ket tartalmazó sejtes frakció begyűjtésére. Napjainkban a 20 éves kor feletti felnőttek allogén transzplantációjának majdnem 80%-át ilyen módon, azaz a perifériás vérből gyűjtött vérsejtekkel végzik (6). Ez a technológiai váltás a donorok számának jelentős növekedéséhez vezetett, ami jelentősen növelte a HSCT-re szoruló betegek túlélési esélyeit. Manapság az őssejtbankok és donorregiszterek révén egy amerikai vagy egy európai kaukazoid származású betegnek 90%-os eséllyel találunk megfelelő, nem rokon donort (7). Végül a csontvelő és a perifériás vér mellett használatos harmadik lehetséges HSC forrás a köldökszinór vér (6).

A köldökszinór vér, mint harmadik lehetséges őssejtforrás, csak közelítőleg 25 éve vált elérhetővé. A köldökszinór vér használatának egyik legnagyobb előnye a hozzáférhetősége, hiszen a születés után a köldökszinór egy felesleges hulladék, melynek begyűjtése a donor számára nem okoz semmilyen addicionális beavatkozást. Ezen túlmenően másik lényeges előnye, hogy a köldökszinór vérben található immunsejtek naivitása miatt ezen sejtek használatakor kell a legkisebb donor-recipiens egyezést (4-6/6) elérnünk. Sajnos azonban a köldökszinór vér nagyon alacsony számban tartalmaz

HSC-ket, ezért inkább gyermekkorú és kis testtömegű felnőtt recipienseken alkalmazzák, hiszen a sikeres transzplantáció alapfeltétele a $3-5 \times 10^8$ /recipiens/ttkg mononukleáris sejt, vagy $3-5 \times 10^6$ /recipiens/ttkg CD34+ őssejt beadása, így a köldökzsínór vérből származó sejtek mennyisége csak ritkán elegendő egy felnőtt transzplantációjára (8). Emellett további probléma, hogy ha mégis végrehajtható az átültetés, a graft forrása kimerül, és nincs lehetőség további, graftot igénylő beavatkozásokra, elsősorban donor limfocita infúzióra (DLI), illetve második transzplantációra. Továbbá ez esetben megnő az esély a fertőzések kialakulására is, hiszen ezek a sejtek még egyrészt igen éretlenek, másrészt még semmilyen kórokozóval sem kerültek kapcsolatba, azaz a graft memóriasejt-mentes is egyben. Végül a köldökzsínórvér hátrányai közé sorolható még az alacsonyabb graft megtapadási arány és az immunszuppresszió növekedett kockázata.

A különböző HSC források előnyeit és hátrányait, legfontosabb jellegzetességeit az **1. Táblázat** mutatja be.

1. Táblázat: A különböző őssejtforrások paraméterei.

Sejtes paraméterek	Őssejtforrás		
	Csontvelő	Perifériás vér	Köldökzsínór vér
Őssejt tartalom	Megfelelő	Jó	Alacsony
Progenitor sejt tartalom	Megfelelő	Magas	Alacsony
T-sejt tartalom	Alacsony	Magas	Alacsony, általában funkcionálisan éretlen sejtek
Tumor sejt kontamináció esélye	Magas	Alacsony	Elhanyagolható

2.1.2 Az őssejt-transzplantáció típusai

A HSCT-nek két fő típusa ismert: az autológ illetve az allogén transzplantáció. Az autológ transzplantáció során a beteg saját őssejtjeit kapja vissza, így logisztikailag és kivitelezését tekintve egy sokkal egyszerűbb eljárásról beszélhetünk, mint az allogén változat esetén. Emellett mivel saját sejtek beadása történik, nem merülnek fel szövet-összeférhetőségi (hisztokompatibilitási) különbségek, azaz sem a graft, sem a recipiens nem ismerheti fel idegenként, ezáltal nem károsíthatja vagy lökheti ki a másikat. Autológ transzplantációban emiatt nincs szükség immunszuppresszív terápiára a szövet-összeférhetőségi antigének különbségéből eredő mellékhatások kialakulásának, azaz a

recipiens/host testéből a graft kilökésének (host versus graft, HvG), vagy a graft által a recipiens szervezetében okozott szövethátrányosításnak (graft versus host betegség, GvH, GvHD) a megelőzésére, kivédésére, kezelésére. További előny, hogy kisebb az opportunista fertőzések kialakulásának kockázata, és az immunológiai rekonstrukció is lényegesen gyorsabban megy végbe, mint allogén transzplantáció esetén. Az autológ HSCT-t az idősebbek is jobban tolerálják, hiszen nincs immunszuppresszív kezelés, ezért a kezelés okozta halálozás 5% alatti, míg a graft megtapadási problémák ritkák (9, 10).

Azonban számos előnye mellett az autológ transzplantációnak nagyszámú hátránya is ismert. Számos rosszindulatú vérképzőszervi megbetegedésben előfordul, hogy a malignus sejtek jelen vannak a vérben illetve a csontvelőben, így az autograft kolonogén tumor sejtekkel szennyeződhet, ami értelemszerűen növeli egy relapszus esélyét. A legtöbb rosszindulatú megbetegedés esetében valóban dokumentált, hogy autológ transzplantációt követően magasabb relapszus aránnyal számolhatunk, mint allogén transzplantáció esetén. Ennek hátterében ráadásul nem csak a kontamináció, hanem a terápia alapját képező nagy dóziszú citoreduktív kezelés is állhat. Az előzetes terápiaként szolgáló alkilező szerek, illetve purin analógok többszöri alkalmazása mellett ugyanis magas kockázattal alakulhat ki másodlagos akut leukémia is (11, 12). Végül a magas relapszus arányhoz szintén hozzájárul a graft versus leukémia hatás (GvL) elmaradása is. A GvL során a grafttal kapott immunkompetens sejtek a beteg reziduális tumor sejtjeit felismerve és azokat eliminálva fejtik ki tumor-ellenes hatásukat. Az autológ transzplantáció során a beteg önmaga donora, így nincsenek önmagát és a daganatsejtjeit idegenként felismerő immunkompetens sejtjei sem, ezért nem számolhatunk a GvL jótékony hatásával. A GvL kiváltására kizárólag allogén transzplantáció esetén van lehetőség.

Az autológgal szemben az allogén transzplantáció során a beteg nem saját, vagyis valamelyik családtag, rokon vagy idegen donor egészséges őssejtjeit kapja meg. A graft így mindig kontamináció mentes, ugyanakkor tartalmaz donor eredetű, azaz mind a recipienst, mind annak daganatsejtjeit potenciálisan idegenként felismerő, immunkompetens sejteket is. Ezen sejtek hozzájárulnak mind a GvH, mind a GvL hatás kialakulásához. Ezáltal allogén HSCT-ben nagyobb a recipienst károsító válasz kialakulásának kockázata, de egyben kisebb a relapszus kialakulásának esélye is.

A graft-mediált GvL mechanizmusa és jelentősége komplex kérdéskör, melynek felfedezéséhez és megértéséhez hosszú út vezetett. Először megfigyelték, hogy allogén transzplantációban egy T-sejt mentesített graft alkalmazásakor ugyan kisebb a GvH-szövetkárosítás, de egyben mindig magasabb a relapszus, azaz a daganatos alapbetegség kiújulásának az aránya is (13). Mindez arra utalt, hogy az allograft nem csak károsíthatja a recipiens szervezetét (GvH), hanem a daganatsejtek számát, azaz a relapszus esélyét is csökkentheti egyben (GvL). Ezután számos kísérlet történt a GvH és a GvL hatás szétválasztására, az előbbi csökkentésére az utóbbi gyengítése nélkül, azonban nem sok sikerrel, részben mivel e folyamatok háttere sem volt teljesen ismert (13). A kezdetekben alkalmazott T-sejt mentesített graft adása, amitől a GvH elmaradását vártak, mindennemű kiegészítő terápiás módosítás nélkül nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket. Igaz csökkent a GvH kialakulásának esélye, hiszen nem voltak jelen a szövetkárosodásért felelős citotoxikus T-sejtek, ám a GvL elmaradása mellett nőtt egyes vírusfertőzések kialakulásának kockázata is. Ezen túlmenően pedig magas számban alakult ki graft megtapadási probléma a szabályozó, vagyis regulatórikus T-sejtek hiánya miatt, így e stratégia alkalmazhatósága összességében igen limitáltnak bizonyult. Manapság bizonyos fokú T-sejt-depléción ugyan részét képezi az aHSCT kezelésnek, azonban ez mindig különböző kiegészítő terápiákkal kiegészítve történik, melyekről részletesen a Fejlesztés alatt álló és vizsgálati szakaszban lévő terápiák c. fejezetben lesz szó.

Az allogén átültetések során emellett még számos további potenciális szövődménnyel számolhatunk, mint például a kezelés okozta szervi citotoxicitás, a GvH hatás, illetve a graft megtapadási problémák. Az immun-rekonstrukció allogén HSCT-ben általában lassabb, és emiatt az oppurtunista fertőzések kialakulása is gyakoribb. A GvH és a HvG csökkentése érdekében a transzplantációt megelőzően a beteggel fő szövet-összeférhetőségi antigén (HLA) szinten minél jobban egyező egészséges donort kell keresni, illetve ennek kiderítésére donor-recipiens vizsgálatokat kell végezni. A donortól kapott graft befogadására mindig immunszuppresszív kezelést kell végrehajtani, amely szövetkárosodás kialakulásához vezet. Összességében tehát a kezelés kockázatai nagyobbak, és a terápia okozta halálozás szignifikánsan magasabb, mint az autológ átültetés esetén, és ezen kockázatok jó része a donor és recipiens között HLA-szinten megjelenő különbséggel arányosan nő.

A fentiekből következik, hogy a HSCT kivitelezésének megtervezése során mindig figyelembe kell venni a beteg rosszindulatú daganatának típusát, a beteg életkorát, a rendelkezésre álló donorok elérhetőségét, a begyűjthető daganat mentes autograft lehetőségét, a beteg állapotát és betegségének stádiumát (érintett-e a csontvelő, fennáll-e kemoszenzitivitás stb.). Az eddigiekben részletezett előnyöket és hátrányokat figyelembe véve az allogén transzplantációt elsősorban leukémiák és mielodiszplázias szindrómák kezelésére, míg az autológ eljárást inkább limfómákban és mielómákban, illetve ritkán, egyes szolid tumorokban alkalmazzák. Ugyanakkor tény az is, hogy az allogén transzplantációban bevezetésre került egyes, a kockázatokat jelentősen csökkentő újítások, pl. a csökkentett intenzitású vagy nem mieloablatív kondicionálás bevezetésének hatására az eddig autológ transzplantációval kezelt megbetegedések esetében is mind gyakrabban van lehetőség allogén átültetésre és így a GvL hatás kiaknázására. Minderről részletesen a későbbiekben lesz szó.

A beteg paraméterein túl másik fontos szempont az időzítés. Rosszindulatú vérképzőszervi betegségek kezelése esetén a legjobb eredmények általában akkor érhetőek el, hogyha a transzplantációt a betegség korai szakaszában végézik, amikor a rosszindulatú daganatsejtek még érzékenyebbek a kemoterápiára, és a tumor teher alacsony. Kezdetben a betegség még jól szabályozható a kemoterápia kevésbé toxikus formáival, míg a késői időablakban végzett transzplantáció esetén mindig számolni kell az erősebb immunszuppresszió okozta szövethárosodás, a relapszus, a kezeléssel kapcsolatos toxicitás, a beteg általános és immunrendszeri állapotának romlása és az időközben fellépő fertőzések okozta komplikációk fellépésével. Összességében azonban a HSCT eljárások nagy részéről elmondható, hogy a betegség korai szakaszában, illetve olyan betegeknél alkalmazhatóak különösen hatékonyan, akiknél nagy a kockázat a relapszus kialakulására.

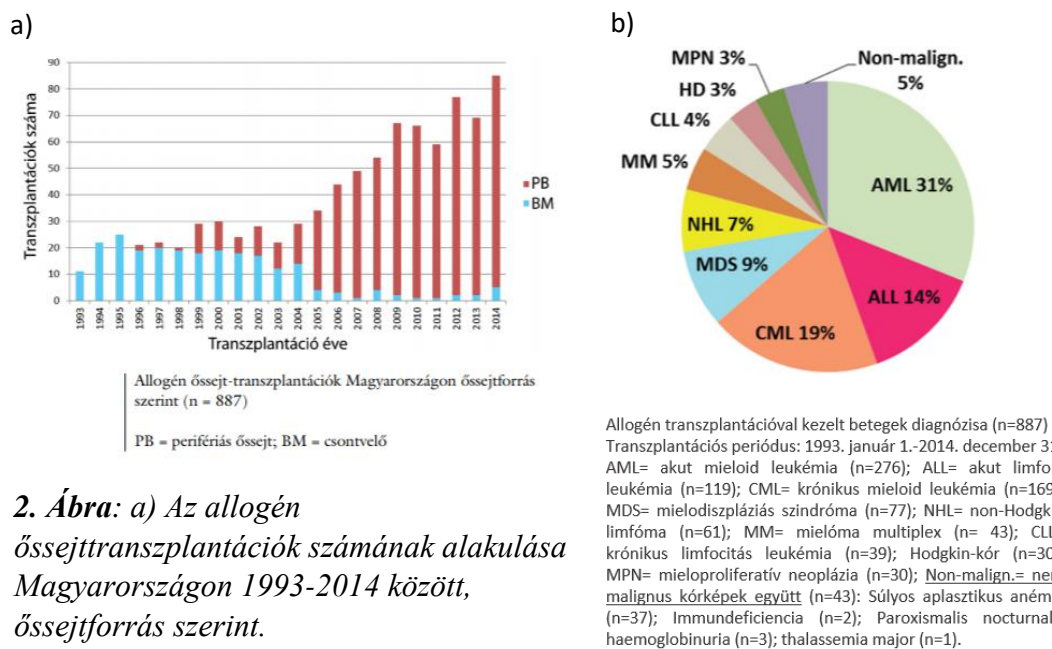
Az eljárás legfőbb klinikai indikációit a transzplantáció típusa szerint csoportosítva a **2. Táblázat** foglalja össze. Mivel PhD munkám témája a GvHD jelenségének kutatása, a továbbiakban részletesen az allogén csontvelő-transzplantációval fogok foglalkozni.

2. Táblázat: A HSCT legfőbb indikációi, Forrás: (14)

HSCT indikációk			
Autológ transzplantáció		Allogén transzplantáció	
Malignus	Nem malignus	Malignus	Nem malignus
Mieloma multiplex	Autoimmun betegségek (pl: SLE)	Leukocita adhéziós defektus, Leukocita tapadás hiánya	Diamond-Blackfan anémia
Non-Hodgkin-limfóma	Amiloidózis	Shwachman-Diamond szindróma	Wiskott-Aldrich-szindróma
Hodgkin-limfóma		Súlyos veleszületett neutropénia	Súlyos kombinált immunhiány (SCID)
Akut mieloid leukémia		Mieloproliferatív rendellenességek	Sarlósejtes vérszegénység
Neuroblasztóma		Egyes anyagcsere megbetegedések	Thalassémia major
Csírasejt tumorok		Mieloproliferatív rendellenességek	Fanconi anémia
		Tiszta vörösvérsejt aplázia	Aplasztikus anémia
		Krónikus mieloid leukémia	
		Tiszta vörösvérsejt aplázia	
		Hodgkin-limfóma	
		Non-Hodgkin-limfóma	
		Akut mieloid leukémia	
		Akut limfoblasztos leukémia	
		Myeloma multiplex	
		Krónikus limfocitikus leukémia	

2.1.3 Az allogén transzplantáció

Az allogén transzplantáció (aHSCT) úttörőjének E. Donnall Thomas és munkatársai tekinthetők, akik 1957-ben elvégezték az első ilyen típusú átültetést (15). Egy 2016-ban megjelent publikáció szerint az európai HSCT-k 2014-ig történő 20 éves monitorozása alapján elmondható, hogy Európában évente több mint 40 000 transzplantációt végeznek, melynek kicsit kevesebb, mint a fele (43%) allogén transzplantáció (16). Ez a szám évről-évre növekedést mutat, főleg a kelet-európai országok esetén. A folyamatból hazánk is kiveszi a részét, többek között 2016-ban a budapesti Dél-pesti Centrum Kórház, Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet, Össejt-transzplantációs Osztálya mellett Magyarország második felnőtt allogén transzplantációs osztálya is megnyílt Debrecenben. Természetesen a magyarországi esetszámok sokkal szerényebbek, mint a nyugat-európai vagy amerikai centrumokéi, de a kezdeti éves 40 transzplantációhoz képest mára több, mint 70 felnőtt allogén átültetéssel számolhatunk (1). Az eljárás fő indikációi Magyarországon az akut leukémia (akut mieloid leukémia [AML]: 31%, akut limfoid leukémia [ALL]: 14%), növekvő számú mielodiszplázia (MDS: 9%), non-Hodgkin limfóma (NHL; 7%), mielóma multiplex (MM; 5%), míg a krónikus mieloid leukémiás (CML: 19%) betegcsoport száma a 2000-es évekhez képest visszaszorult. Ezen betegek számára sok esetben az aHSCT az egyetlen kuratív módszer. A betegek számának alakulása, illetve a legfőbb betegség indikációk a **2. Ábrán** láthatóak.



2. Ábra: a) Az allogén össejttranszplantációk számának alakulása Magyarországon 1993-2014 között, össejtforrás szerint.

b) Az allogén transzplantáción átesett betegek alapbetegségének százalékos eloszlása 1993-2014 között. Forrás: (1)

Az aHSCT első lépése a megfelelő donor (sejtforrás)-recipiens (beteg) pár megtalálása. Az allogén donor lehet HLA-azonos testvér, HLA-azonos vagy nem teljesen azonos rokon, és HLA-azonos nem-rokon (unrelated) önkéntes egyén. A transzplantáció szempontjából megfelelő testvér vagy családi donor aránya kb. 35 %, míg a nemzeti és nemzetközi regiszterek segítségével kb. 50-60 %-ban lehet megfelelő önkéntes, nem rokon donort találni a betegek számára (8).

2.1.3.1 A HLA gének jelentősége a transzplantációban

A transzplantációs folyamat során az elsődleges cél a HLA szinten leginkább egyező donor- recipiens pár megtalálása. A megfelelő donor kiválasztásakor a recipiens és a donor MHC-szintű egyezését vizsgálják, melyet mindig két haplotípus számmal és a két szám közötti per-jellel jelölik. Például egy 6/6-os egyezés esetén a vizsgált gének száma 3 (aHSCT-ben jellemzően ezek a HLA-A, -B, -és DR, ld. később) melyeknek összesen 6 allélja kerül vizsgálatra, illetve ebben az esetben a donor és a recipiens között teljes egyezés áll fent.

Természetesen nem teljes egyezés esetén is elvégezhető az eljárás, de ezekben az esetekben mindig számolnunk kell a transzplantáció egyik legfőbb, életet veszélyeztető mellékhatásával, az akut GvHD kialakulásával (lásd későbbi fejezet). Ezen régiók transzplantációs célra történő vizsgálata nagy felbontású HLA-DNS genotipizáláson alapszik, mely történhet Sanger szekvenálással és PCR-rel is (17, 18). A transzplantációs vizsgálatok során leggyakrabban a poszttranszplantációs jelentőségű HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ és -DP régiókat vizsgáljuk. Kiderült az is, hogy a HLA I osztály tagjainál (-A, -B, -C) fellépő eltérések a fő okozói az akut GvHD-nak, míg a HLA-A és -B a hosszú távú poszttranszplantációs túlélés szempontjából meghatározó. Természetesen a HLA II osztály tagjaiban lévő egyezés szintén csökkenti a GvHD kialakulásának esélyét, és jobb túlélést biztosít, ám transzplantációs szempontból a DRB1 egyezés kiemelt fontosságú a beteg túlélése és a súlyos GvHD elkerülése szempontjából. A HLA eltérések hatását a túlélésre a **3. Táblázat** tartalmazza (18).

3. Táblázat: HLA lókuszt eltérések hatása a túlélésre Forrás: (18)

Tanulmány	HLA lókuszt eltérések hatása a túlélésre			
	A	B	C	DRB1
Petersdorf et al.(19)	Együttesen csökkenés			Csökkenés
Morishima et al.(20)	Csökkenés	Csökkenés	Ø	Ø
Flomenberg et al.(21)	Csökkenés	Csökkenés	Csökkenés	Csökkenés
Lee et al.(22)	Csökkenés	Ø	Csökkenés	Csökkenés
Park et al.(23)	Ø	Csökkenés	Csökkenés	Ø

Az allogén HSCT számára a legalkalmasabb HSC donor a HLA identikus testvér, vagy a beteggel teljes egyezést mutató HLA-azonos családtag. Ekkor a DNS-alapú módszerekkel vizsgált régiók a HLA-A, -B és DRB1, melyeknek minimum követelményként teljes egyezést (6/6) kell mutatnia. A vizsgálatok esetleg kiegészíthetők a HLA-C és -DQB1 régiók elemzésével is, de ezek jelentősége másodlagos. Ebben az esetben 5 gén összesen 10 allélja kerül vizsgálatra, így a teljes egyezést 10/10-nek jelöljük. Ha a családon belül ilyen donor nem áll rendelkezésre, akkor a rokonságból kell olyan donort keresni, aki a HLA-A, -B, -C és -DRB1 régiókban is teljes egyezést mutat a recipienssel (8/8). Egy amerikai felmérés szerint a transzplantálásra kerülő betegek több mint kétharmada számára nem találunk teljes egyezést mutató családi donort (24). Ezekben az esetekben a következő számba vehető lehetőség, egy erős, de nem teljes egyezést mutató rokon donor keresése (24). Ekkor két eshetőség áll fenn a HLA egyezés mértéke alapján; az egyik az egyetlen MHC antigénben eltérő, míg a másik lehetőség pedig egy haploidentikus donor keresése. Az egy antigén eltérés esetén vizsgált régiók a HLA-A, -B, -C és -DRB1, és a minimum követelmény a 7/8 egyezést mutató, azaz például egyetlen cross-overt hordozó testvér választása. A haploidentikus donor esetén továbbra is a beteg rokonai között keressük a megfelelő donort, és vizsgált régiók a HLA-A, -B, -C és DRB1, melyekből a donornak a recipienssel legalább 4/8 egyezést kell mutatnia, lókuszonként csak egy eltéréssel. Sajnos a haploidentikus transzplantáció esetén mindig számolnunk kell a HLA-szenzitizált betegek esetén a graft kilökődésével (25). Ha a családban egyik lehetőség sem adott,

akkor a hazai és nemzetközi adatbankokban nyilvántartott önkéntes nem-rokon donorok (unrelated donor) nyújthatnak segítséget. Számos tanulmány és összefoglaló alapján ahhoz, hogy minimumra csökkenthető legyen a transzplantáció okozta halálozás, nem rokon donor esetében a donornak és a recipiensnek 8/8 egyezést kell mutatnia HLA-A, -B, -C és a DRB1 régiók tekintetében. Végül, ha ilyen donor sem áll rendelkezésre, akkor még mindig számításba vehető az elfogadható halálozási rizikóval járó 7/8 eltérést mutató donor sejtjeinek használata (22). Természetesen a minél tökéletesebb egyezés jelenti a legkisebb rizikóforrást, így mindig az ilyen donor használatára kell törekedni.

2.1.3.2 A transzplantáció előkészítése - a kondicionálás

Az aH SCT végrehajtása során a megfelelő donor megtalálását követően a következő lépés a beteg kondicionálása. A kondicionálás célja, hogy az alapbetegség daganatsejtjeinek számát csökkentse, illetve, hogy a beteget, azaz az őssejt-transzplantáció recipiensét immunszupresszált állapotba hozza, ezzel megteremtve a megfelelő körülményeket a donortól kapott őssejt graft megtapadására. A kondicionálás lehet kemoterápia, vagy kemoterápiával kiegészített radioterápia. Természetesen minden indikáció más és más kezelést von maga után, mely kezelési eljárásokat intenzitásuk alapján csoportosítjuk. Az intenzitás alapján beszélhetünk teljes mieloablatív (MAC), csökkentett toxicitású, vagy csökkentett intenzitású (RIC) és végül nem-mieloablatív kondicionálásról (NMC) (2, 26).

A MAC során lényegében teljes, irreverzibilis csontvelő apláziát érnek el úgy, hogy a betegeket 3-4 frakcióban adott 12 Gy dózisú, teljestest-besugárzással (TBI, total body irradiation) és/vagy kemoterápiás ágensekkel, pl. ciklofoszfammal, etopoziddal, melphalánnal, buszulfánnal, citarabinnal, ciszplatinnal, doxorubicinnel illetve immunterápiával például antitimocita-globulinnal kezelik. Az antitimocita-globulin egy nyúl poliklonális antitest-keverék, mely a T-sejtek deplécióját váltja ki. Ha a kezelés indikációja valamilyen hematológiai daganatos megbetegedés volt, akkor e szerek citotoxikus hatása miatt nem csak az immunszupresszió érhető el, hanem a tumorsejtek pusztulása is fellép: ennek természetesen ára is van, amennyiben a kezelést gyakran súlyos szervkárosodás is kíséri, különös tekintettel a szívre (ciklofoszfamid, doxorubicin), májra (etoposid), a központi idegrendszerre (citarabin) és a tüdőre (buszulfán). Ez a kondicionálási forma a kezelés erőssége miatt sajnos csak jó egészségi állapotban lévő fiataloknál alkalmazható, jórészt kizárva az idősebb betegekben való alkalmazhatóságát.

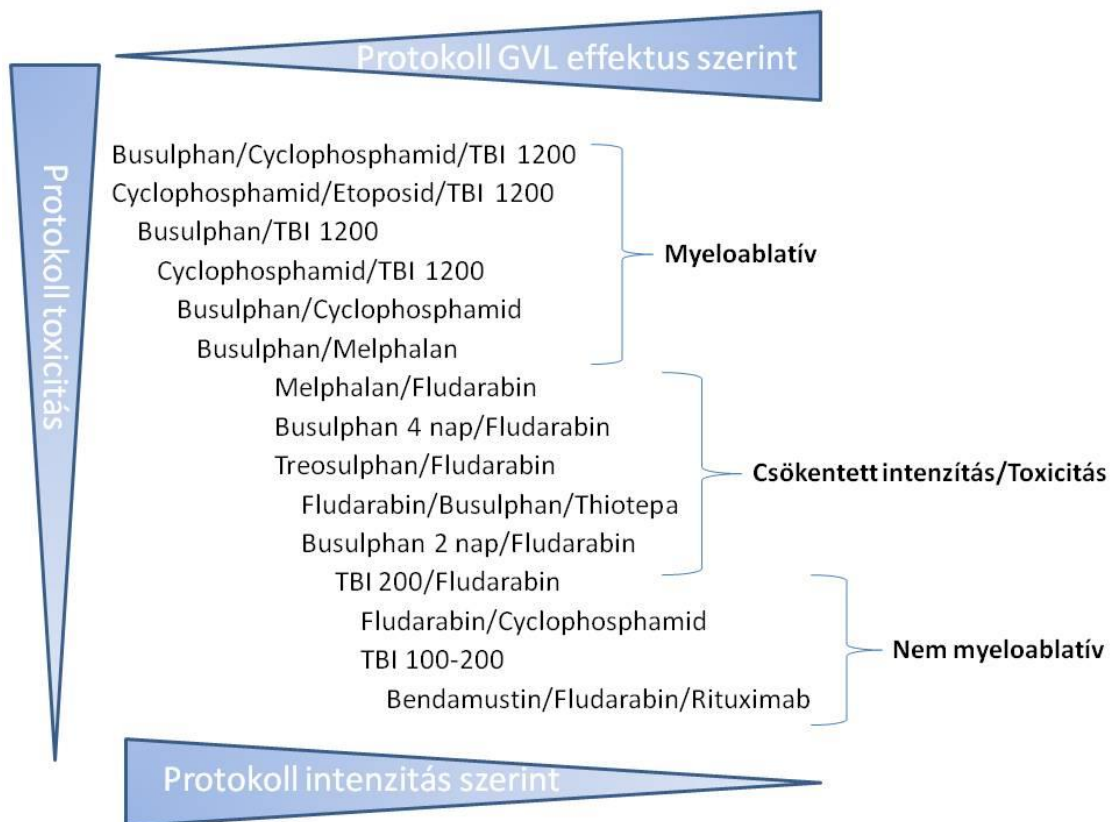
Ezt a kondicionálási stratégiát általában ALL-ben vagy high-grade non-Hodgkin szindrómában alkalmazzák. A folyamat végén teljes donor kimérizmus alakul ki, azaz a vérképzés és a hematopoetikus sejtek teljes egésze lecserélődik egy a recipiens szervezetétől eltérő genetikai háttérű sejtekre.

A következő két kondicionálási típust, vagyis a csökkentett intenzitású (RIC) és non-mieloablátív kondicionálást (NMC) a GvL hatás maximalizálásának igénye hívta életre. A GvL hatás eléréséhez szükség van ugyan az immunkompetens sejtek bevitelére, ám nem feltétlenül szükséges a bevitt megelőző magas dózisú mieloablátív kondicionálás végrehajtása. Mindkét kezelési típus a MAC-nál enyhébb fokú kondicionáláson alapul; míg a RIC egy köztes kondicionálási forma, mely során a mieloablátív kondicionáláshoz képest alacsonyabb, míg az NMC-hez képest magasabb dózisban kerülnek alkalmazásra a citotoxikus ágensek, addig az NMC erősen csökkentett dózisokat alkalmaz. Ez azt eredményezi, hogy a beteg vérképző őssejtjeinek és esetleges daganatsejtjeinek egy jelentős része életben marad, így a kezelés inkább a donor sejtek effektor hatására alapoz, vagyis a graft tumor ellenes funkciójára (GvL), mintsem a preparatív kezelésnek a fennálló betegséggel szembeni citotoxikus hatására. Ezáltal a felépülés gyorsabb lesz, így a terápia idősebb korú, a toxikus mellékhatásokat nehezebben toleráló pácienseknél is használható, bővítve a transzplantálhatók körét. Így számos, elsősorban idősebbeket érintő rosszindulatú hematológiai kórkép esetén a RIC és az NMC juttatja el a terápiát a leggyakoribb beteg-korcsoportokhoz (az MDS átlagosan 75 éves, a CLL 70 éves, a MM 65 éves korban kerül diagnosztizálásra).

A RIC esetén mindig kell számolnunk citopénia kialakulásával, mely jelentős morbiditás mellett komoly mortalitást okozhat, és emiatt az eljárás mindig hematopoetikus őssejt-transzplantációt igényel. A kezelés során a recipiens immunrendszere elnyomásra kerül, így lehetővé téve a graft beépülését. RIC kondicionálásra először 1998-ban került sor, mely kezelés anti-limfocita gyógyszeres kezeléssel és anti-tumorális kemoterápián alapult. A leggyakrabban alkalmazott terápia a fludarabin kezelés valamely buszulfán, ciklofoszfamid vagy melfalan kemoterápiás készítménnyel kiegészítve. A folyamat végén kevert kimérizmus alakul ki, ami azt jelenti, hogy a vérképzést kialakító sejtek részben donor, részben recipiens eredetűek lesznek, hiszen a kisebb toxicitás miatt a recipiens sejtjeinek egy része is életben marad a bevitt donor sejtek mellett. Érdekesség, hogy az eljárás első leírója Dr. Kelemen Endre magyar hematológus professzor volt (27).

A RIC-el szemben az NMC tovább csökkentett, minimális citopéniát, ám jelentős limfopéniát okoz, és nem feltétlenül igényel őssejt-transzplantációt. Érdekeség, hogy az NMC-t követően mégis teljes donor kimérizmus alakul ki, mivel a transzplantált donor eredetű T-sejtek végül eliminálják a recipiens hematopoetikus őssejtjeit, illetve a kezelés részét gyakran képezi a transzplantációt követően adott donor limfocita infúzió (DLI), mely tovább segíti a teljes donor kimérizmus kialakulását.

Természetesen azt, hogy melyik kondicionálási stratégia kerül kiválasztásra, nagyban meghatározza a betegség típusa és súlyossága, a beteg kora, társbetegségei, a donor-recipiens HLA egyezése és egyéb faktorok is. A különböző kondicionáló kezelések összefoglaló összehasonlítása a **3. Ábrán** látható.



3. Ábra: A kondicionáló kezelések hatása toxicitás, intenzitás és GvL hatás szerint.

Forrás:(2)

2.1.3.3 *A transzplantáció*

A kondicionálást követően a beteg készen áll az őssejt graft befogadására. Az őssejt beadása viszonylag egyszerűen, közvetlenül a keringésbe történik, ahonnan specifikus homing szignálok hatására ágyazódnak be a csontvelőbe. A folyamat során a vaszkuláris sejt adhéziós molekula-1, a heparán-szulfát, az SDF-1 és annak receptora, a CXCR4 kemokin receptor játsszák a főszerepet. Mivel az őssejtkészítmények a leggyakrabban fagyasztva érkeznek, a beadás során számolni kell a fagyasztáshoz használt DMSO jelenlétével. A szobahőmérsékletű DMSO sejtméreg, így gyakran okoz minimális toxicitást, mint kaparó érzést a torokban, kellemetlen fohagymához hasonló szájízt, illetve ritkán hasi fájdalmat vagy veseelégtelenséget. A graft megtapadtnak tekinthető, hogyha az abszolút neutrofil granulocita szám 3 egymást követő napon meghaladja az 500 neutrofil/vér µl-t.

2.1.3.4 *A transzplantáció kiterjesztése - a donor limfocita infúzió*

Feltételezve azt, hogy a grafttal átvitt immunitás aktivitásának növelése jótékony hatású lehet egy esetleges relapszus után, 1988-ban először alkalmazták a donor limfocita infúziós (DLI) eljárást relapszusos CML-ben szenvedő betegeken, mellyel második remissziót sikerült elérni (28). A DLI, mint ahogy a neve is sejteti nem más, mint az őssejt-transzplantációt követően adott idegen, kevert limfocita sejtek (CD4+, CD8+ T-sejtek, Treg-sejtek, NK-sejtek és antigén prezentáló sejtek) infúziós bevitele a GvL hatás felerősítése céljából. Az általában NMC vagy RIC, igen ritkán MAC transzplantációt követően adott DLI tartós vagy teljes remissziót képes előidézni olyan betegeknél, akiknél az őssejttranszplantációt követően relapszus alakult ki. A RIC és NMC alkalmazása önmagában, DLI nélkül ritkán képes klinikailag jelentős GvL hatást kiváltani (29). A DLI mechanizmusát tekintve ellensúlyozza a rezidens citotoxikus T-sejtek kimerülését, amely a hosszú ideje fennálló antigén hatására alakul ki (30). Ezen túlmenően képes a T-sejt receptor szintek és aktivitás normalizálására, az allogén T-sejtek klonális expanziójára, valamint a T- és B-sejtes immunitás jobb összehangolására, így elősegítve a daganatellenes effektor funkciók újrarahangolását (31). A DLI-vel létrehozott GvL hatás legfőbb célpontjai lehetnek a nem betegség specifikus antigének, például a minor hisztokompatibilitási antigének, a mutációval létrejött neo-epitopok, illetve a betegség specifikus antigének is (például BCR/ABL fúziós protein). A DLI-re reagáló betegek általában 2-3 hónappal az infúzió beadását követően mutatnak immunválaszt, ám

a teljes válasz lefolyása akár évekig, sőt évtizedekig is tarthat (32). Fontos kiemelni ugyanakkor, hogy a hematológiai rosszindulatú megbetegedések GvL-el szembeni érzékenysége különböző, így a DLI kezelés hatékonysága is eltérő. A legjobb eredményeket CML esetén lehet elérni. Azok a betegek, akiknek a CML krónikus fázisában molekuláris relapszusa volt közel 100%-ban, míg azoknál, akiknek a CML krónikus fázisában hematológiai relapszusa volt 75%-ban reagáltak a terápiára. A CML blasztos krízisében kétségtelenül szerényebb számokat látunk, itt ugyanis már csak a betegek 12-35%-a reagált; ám például az AML-ben szenvedő betegek 15-42% teljes remissziós értékeivel összehasonlításban látható, hogy ezek sem elhanyagolható értékek (33).

Manapság a DLI, mint celluláris immunterápia alkalmazása rutin eljárásnak számít aHSCT-t követően, mind a relapszusok kezelésére, mind részleges megtapadás esetén, illetve a relapszus megelőzésére. Alkalmazott dózisa a szuboptimális $<0,01 \times 10^8$ T-sejt/kg sejtszám és a $4,5 \times 10^8$ T-sejt/kg maximum között váltakozhat; $4,5 \times 10^8$ T-sejt/kg sejtszám felett már nem fokozódik az immunválasz. Természetesen a DLI kezelés hatékonyságát is befolyásolja a recipiens állapota, a kondicionálás intenzitása és típusa, a donor-recipiens alloreaktivitása, a recipiens T-sejtek kimerülése, a DLI időzítése, a rosszindulatú megbetegedés típusa és előrehaladottsága, a limfocita dózis és annak összetétele, illetve a HSCT-t befolyásoló egyéb faktorok.

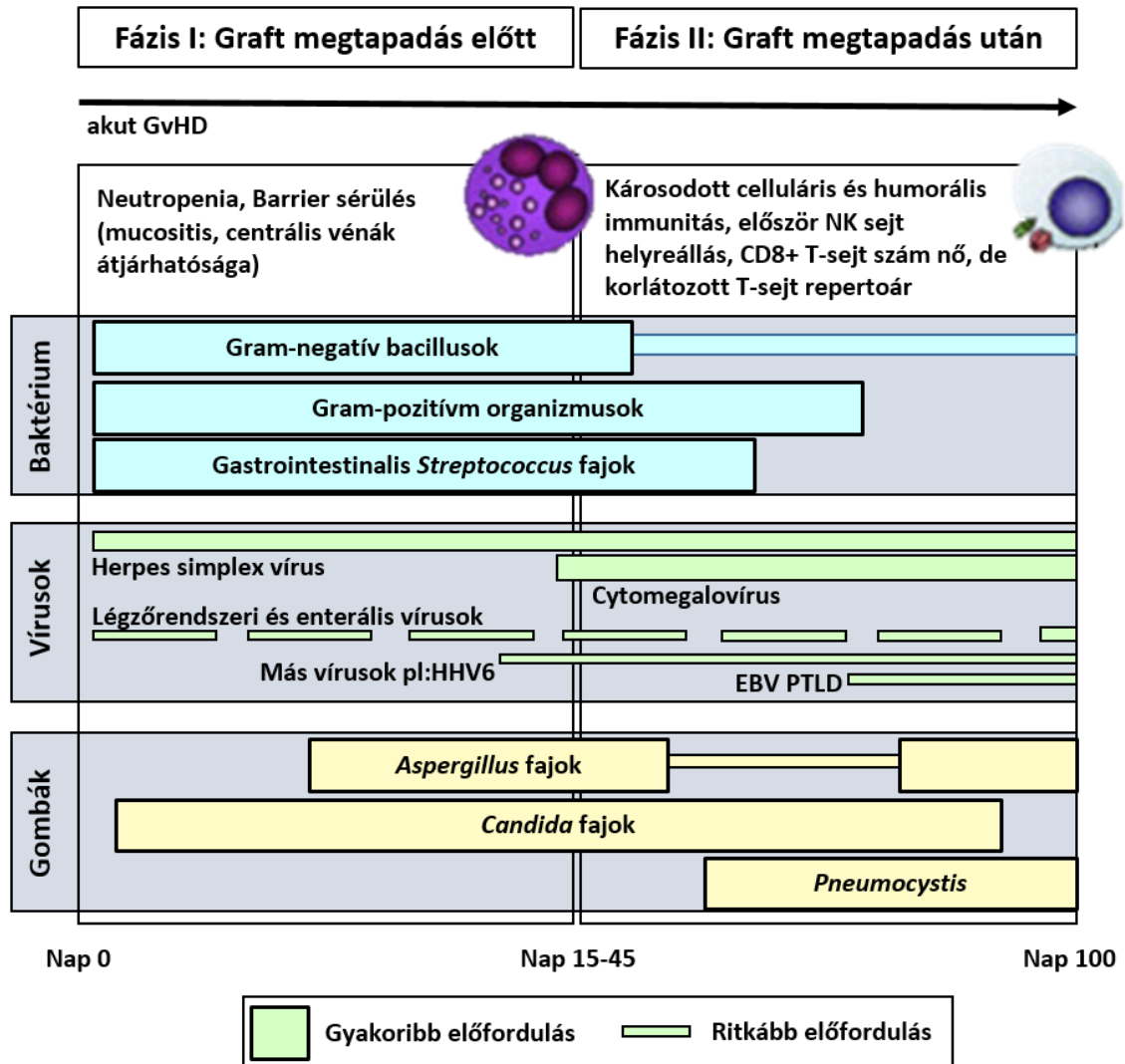
2.1.3.5 Az aHSCT szövődményei

Az aHSCT legfőbb limitációja továbbra is a magas halálozási arány. A legkritikusabb időszak a transzplantációt követő első 100 nap, amikor is a halálozási arány 7% és 27% között változik, az alapbetegség és donor-recipiens egyezés függvényében. A legfőbb transzplantáció okozta mortalitási okok a relabáló alapbetegség, a GvHD különböző formái (17-19%) és a különböző infekciók kialakulása (12-17%) (6). Azok a betegek, akik relapszus nélkül megélik a transzplantáció utáni második évet, 80-92%-os hosszútávú túléléssel számolhatnak, azonban meg kell jegyezni, hogy várható élettartamuk továbbra is 15-20 évvel elmarad a nemben és korban hozzájuk illeszkedő egészséges lakosságétól. Ennek az az oka, hogy még azoknál a betegeknél is, akiknél a transzplantációt követő első két évben nem jelentkezik az alapbetegség relapszusa, 41%-os késői mortalitással kell számolni a fellépő krónikus GvHD, infekciók, szervi elégtelenség és másodlagosan kialakuló tumorok következtében (34).

Ezzel együtt, az utóbbi években fokozatos javulás észlelhető az aHSCT mortalitási mutatókban, melyet elsősorban a szupportív terápia fejlődésének tulajdonítanak. Például olyan magas kockázatú betegségek esetén, mint az akut leukémia, a RIC és az NMC hatékonynak bizonyultak a MAC-hoz képest, hiszen kevesebb toxicitást és komplikációt okoznak a transzplantáció során, miközben hosszabb túlélést biztosítanak (35). A súlyos fertőző betegségek, mint például a citomegalovírus-fertőzés vagy -reaktiváció, és az invazív aspergillózis megelőzésére szolgáló kezelések mára az alap ellátás részét képezik (36).

Ettől függetlenül az aHSCT-t követő halálozás két legfőbb okozója, a relabáló alapbetegség és a GvHD kialakulásának gyakoriságában csak korlátozott javulás látható. A súlyos akut GvHD még mindig a betegek 11-18%-ban figyelhető meg, 70-90%-os mortalitási aránnyal (37, 38). A relabáló alapbetegség hasonlóan komoly probléma, például ALL esetén, melynél a kétéves túlélési arány 14-16%-os. Ez esetben a legeredményesebb kezelési lehetőség továbbra is a második remisszió kialakítása kemoterápiával, majd ezt követően DLI vagy ismételt aHSCT végrehajtásával (39, 40).

Az aHSCT-vel társultan jelentkező leggyakoribb infekciókat az **4. Ábra**, míg a korai- és késői szövődményeket a **5. Ábra** mutatja be.

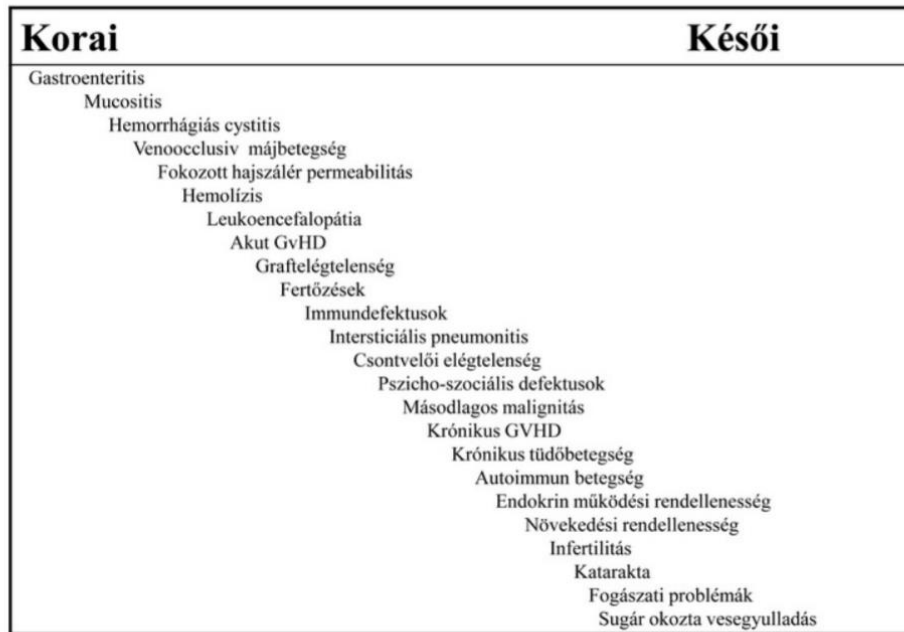


EBV: Epstein-Barr vírus; HHV6: Humán herpeszvírus; PTLD: Poszt-transzplantációs limfoproliferatív betegség

4. Ábra: A leggyakoribb infekciók aGvHD-ban a transzplantációt követő 100. napig.

Forrás: (41)

Az őssejtátültetés szövődményei



Semmelweis Egyetem

5. Ábra: Az aHSCT leggyakoribb szövődményei megjelenésük időrendjében,

Forrás: Prof. Dr. Masszi Tamás engedélyével

2.2 A graft versus host betegség

A GvHD az aHSCT-t követően fellépő leggyakoribb szövődmény. A GvHD egy olyan tünetegyüttes, melynek során a donor immunkompetens sejtjei idegenként azonosítják és megtámadják az immunmediált recipiens szerveit és szöveteit (42). Leggyakrabban akut vagy krónikus formában jelentkezik, melyek nagyon különböző kórképek, és igen eltérő immun-patológiai folyamatok eredményei.

Az akut GvHD (aGvHD) kialakulásában alapvető jelentőségű a kondicionálás hatására bekövetkező bél-barrier károsodás, ami a mikrobióta invázióját okozza, erős lokális gyulladásos választ indukál, majd szisztémás citokinvihart vált ki. Ennek következtében számos, elsősorban recipiens-eredetű, kisebb számban donor eredetű APC érik meg. Ezek a sejtek tömegesen aktiválják a grafttal átvitt, már érett, azaz még a donor tímuszában szelektált, és ezért a recipiens minor és major összeférhetetlenségi antigénjeit idegenként felismerő T-sejteket. A folyamat végül egyes, meghatározott szerveket (bőr, vékonybél, máj stb.) érintő citotoxicitásba kulminál, aminek kialakulásában az $\alpha\beta$ CD8+ T-sejtek

játszák a főszerepet. A kórkép jellemzően gyors lefolyású. Az összes donor forrás tekintetében a betegség kumulatív előfordulási gyakorisága mintegy 40-60%-os (43), míg az egy éves túlélés súlyos (grade III/IV) aGvHD-ban szenvedő betegek esetén csupán 40% (44). Ezek a számok közel sem mondhatók jónak, főleg ha kezelési időt és a kezelési költségeket is figyelembe vesszük.

Ezzel szemben a krónikus GvHD (cGvHD) a kondicionálás kiváltotta tímusz-károsodás és hiányos tímuszfunkció következménye, melynek hatására a graftból újonnan kifejlődő, azaz csak a transzplantációt követően megérő CD4+ Th sejtek negatív szelekciója sérül. Ezek a sejtek a recipiens allo-antigénjeit emiatt idegenként ismerik fel, jellemzően Th2 és Th17 irányba differenciálódnak, és B sejteket illetve makrofágokat aktiválnak. A folyamat autoantitest képzésben, és makrofág-indukálta fibrotikus gyulladásban tetőzik, mely a beteg gyakorlatilag minden szervét érinti, érintheti. A tünetek jellemzően lassan alakulnak ki, de akár évekig, évtizedekig is fennállhatnak (45).

Míg az aGvHD leggyakrabban az aHSCT-t követő első 100 napra tehető, addig a cGvHD kialakulása jellemzően a 100. nap után várható. Természetesen ez egy mesterséges időkorlát, így például lehetséges az úgynevezett late onset aGvHD kialakulása, amely a 100. napot követően jelentkezik, általában az immunszuppresszív gyógyszerek megvonását követően, avagy az akut és krónikus GvHD forma egyidejű megjelenése is, amit overlap szindrómának nevezünk. A 2014-ben az NIH által kibocsájtott új konszenzus GvHD diagnosztikus kritériumok ezt figyelembe véve, a kórkép összetettségére tekintettel, pontosan ezért definiálták a late onset és overlap formákat, illetve oldották fel az akut, és a krónikus GVHD diagnosztikus szétválasztásában még meglévő vitás kérdéseket. Összeségében elmondható, hogy mára már a klinikai tüneteken alapuló, tehát elsősorban a mechanizmus alapján zajló diagnosztikai elkülönítés sokkal inkább használatos, mint az időbeni kategorizálás (46).

Ez azért is előremutató változás, mert a GvHD manifesztációjának időpontját és lefolyását számos faktor, így a kondicionálás, a donor és a recipiens MHC azonossága is befolyásolja. Például a magas intenzitású kondicionálás esetén az aGvHD kialakulása a 2. és 42. hét közé tehető a transzplantációt követően, míg alacsony intenzitású kondicionálásnál általában később jelentkezik. Hasonlóan, a nagyfokú HLA eltérés illetve az általában nem megfelelő profilaxis esetén az aGvHD-nak hiperakut változata is

jelentkezhethet, amely az aHSCT-t követő első két hétben alakul ki, és gyakran halálos kimenetelű (47). A továbbiakban részletesen csak az akut GvHD-t fogjuk tárgyalni.

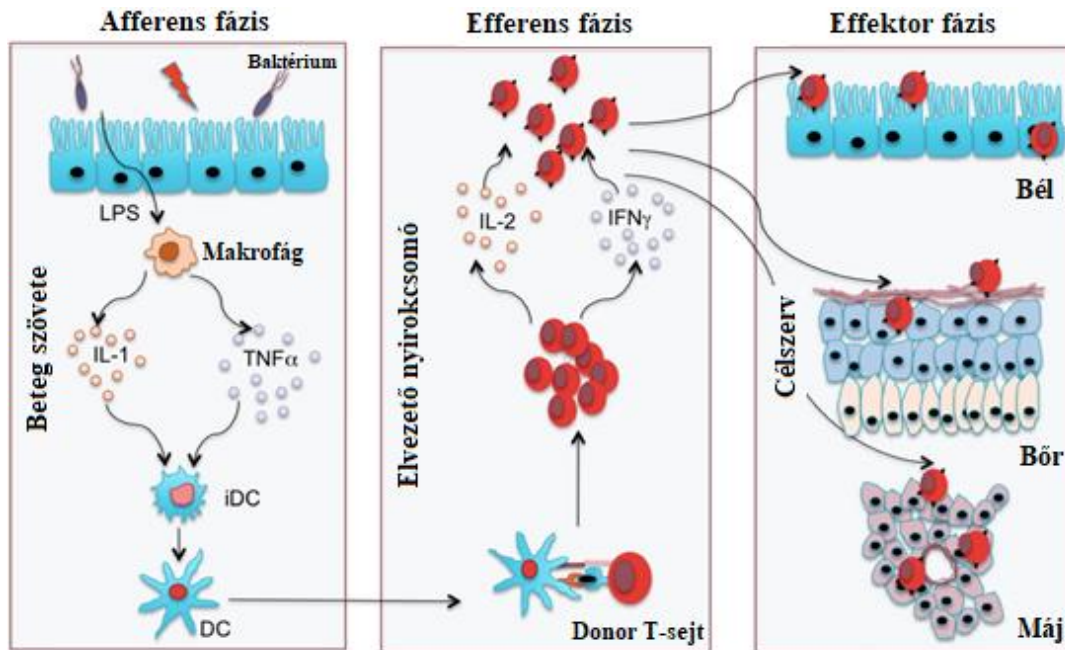
2.2.1 Az akut graft-versus-host betegség

Az akut graft-versus-host betegség tehát az allogén hematopoetikus őssejt-transzplantációt követően fellépő, meglehetősen komplex, összetett kórkép, magas morbiditási és mortalitási mutatókkal. A betegség kialakulásának legfőbb oka pedig az a tény, hogy a recipiens a grafttal együtt megkapja a donor érett CD4+ és CD8+ $\alpha\beta$ T-sejtjeit is.

Az érett T-sejtek átvitelének vannak előnyös következményei, az érett Treg sejtek ugyanis gátolják a graft kilökődését, ezáltal segítve annak megtapadását, az érett Th- és CTL-sejtek bejutása pedig támogatja a kórokozókkal szembeni immunitás rekonstrukcióját, illetve a már előzőekben tárgyalt GvL hatás kialakítását. Ugyanakkor az érett T-sejtek átvitelének, elsősorban a GvHD formájában, lehetnek hátrányos következményei is, ami ezen T-sejteknek a recipiens minor és esetleg major hisztokompatibilitási antigénjei által történő aktivációját igényli. Valóban, az aGvHD kialakulásában a legjelentősebb mozzanatok a donor eredetű T-sejteknek a recipiens (host) hivatásos APC sejtjei általi aktivációja, a host alloantigénjeinek idegenként történő felismerése, majd a lokális szervkárosodás.

A T-sejt aktivációban a természetes és szerzett immunitás szinte minden folyamata részt vesz, és azt szigorú kontroll alatt tartja, aminek jó oka van, mivel potens szabályozó és citotoxikus effektelemeik révén nem csak a kórokozók elhárítását végzik el, de helytelen működésük súlyos következményekkel járó értelmetlen szövetszervi károsító hatást is kiválthat, aminek közismert példái az autoimmun megbetegedések jelentős része, a transzplantált szervek kilökése, vagy maga az akut GvHD. A T-sejt-aktiváció első lépése az idegen antigén felismerése a specifikus TCR segítségével, mely során a testidegen sejt-/szövetfehérjék lebomlási termékeként megjelenő peptidek az MHC által kerülnek bemutatásra. Azonban ez a kölcsönhatás önmagában, a naív T-sejtek esetében jellemzően a DC-k által kifejezett kostimulációs jel nélkül nem elégséges az aktiváció és az azt követő differenciáció elindításához. A kostimuláció elmaradása esetén a sejtaktiváció leáll, funkcionális válaszképtelenség, anergia alakul ki, és aktiválódhatnak egyes immunszuppresszív regulatórikus folyamatok is. Az akut GvHD kialakulására az

erőteljes kostimuláció és a meggyengült immunszuppresszív folyamatok együttes jelenléte jellemző. Klasszikusan az aGvHD három fő fázisra osztható, melyek az afferens, efferens és az effektor fázis (48). A három fő fázis a **6. Ábrán** látható.



6. Ábra: Az aGvHD patomechanizmusa.

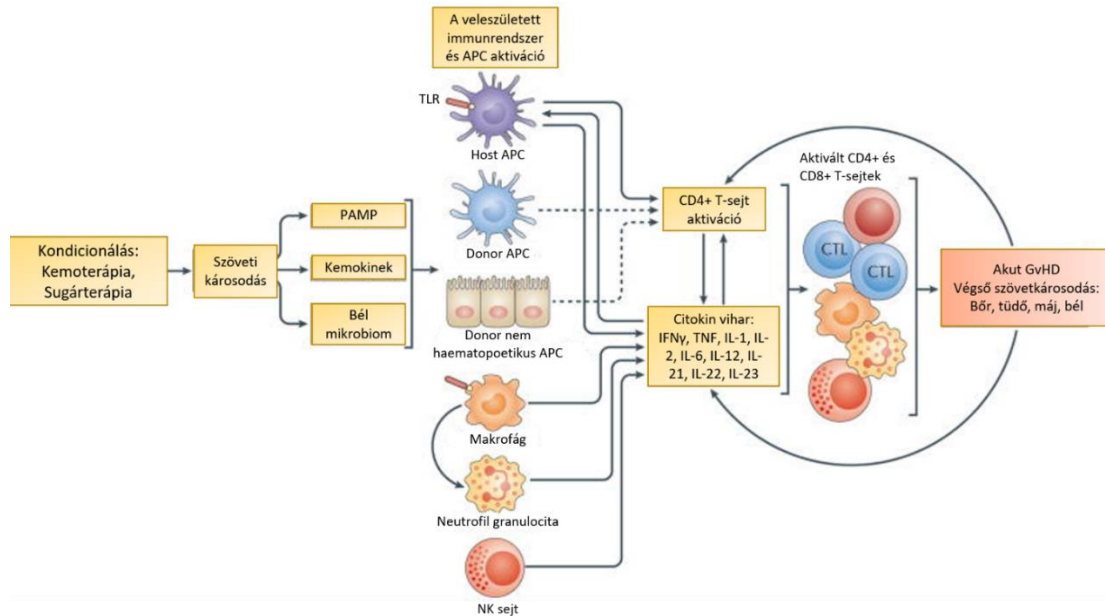
Az első fázis az afferens fázis, melynek fő lépése az APC-k aktivációja (49). A kondicionáló kezelés típusától függetlenül nagymértékű szövetkárosodás figyelhető meg, amelynek szerepe alapvető jelentőségű. Számos tanulmány feltételezi a béltraktust érintő szövetkárosodás kiemelkedő szerepét az aGvHD kialakulásában. A bélben Paneth sejteket és bél őssejteket (ISC) találunk, amelyek közül az ISC-k az epithél megújulásért, többek között a bél barrier integritásának a fenntartásáért, míg a Paneth sejtek egyebek mellett, anti-mikrobiális fehérje termelésük révén a mikrobióta szabályozásáért is felelősek. Mind a kondicionálás, mind az afferens fázisban termelődő citokinek (TNF α , IL-6, IL-1) károsítják a Paneth- sejteket és az ILC-eket, amely emiatt fundamentális jelentőségű esemény az aGvHD kialakulásában (50). A folyamat során termelődő IL-1, IL-6 vagy TNF α emellett fokozza a recipiens sejteiben az MHC antigének, és adhéziós molekulák megjelenését is. A besugárzás és a ciklofoszfamid is növeli a vékonybél permeabilitását (51), amely így lehetővé teszi a baktériumok bejutását és a bél mikrobiomában bekövetkező masszív, a GvHD-ban karakterisztikus változásokat, azaz egyes törzsek hirtelen, nagymértékű felszaporodását, míg mások háttérbe szorulását, és a

sérült bélfal ezt követő bakteriális invázióját (52). A baktériumok bejutásával a patogén asszociált mintázatok (PAMPs) aktiválják a veleszületett immunrendszer sejtjeit, amelyek Th1 és Th17 típusú citokinek termelésével gyulladást váltanak ki. Végül ez a citokin vihar, amely aktiválja a folyamatot megindító főleg recipiens-, kisebb számban donor-eredetű APC-ket. Az aGvHD-t megelőző citokinvihar intenzitására jellemző, hogy ebben a fázisban nem csak a hivatásos APC-k, de a megtámadott szervek egyes parenchymális sejtjei is MHCII-t fejeznek ki, és APC-ké válnak. Ezek az aktivált APC-k többek között minor és major alloantigéneket fognak prezentálni a donoreredetű T-sejteknek (53, 54). A szövethárosodás tehát fontos, de jelentőségében még nem minden részletében ismert faktor a GvHD kórfolyamatában. Nehezen magyarázható érdekesség például, hogy az aGvHD szövethárosító kondicionálás nélkül is kialakulhat DLI kezelést követően, illetve, hogy a RIC alkalmazása mellett nem figyelhető meg csökkent aGvHD reakció.

Ezt követi a második fázis, az efferens fázis, melynek fundamentális jelentőségű lépése a T-sejtek expansiója, és célszervekbe való irányított vándorlása, más néven homingja. Általában a CD8⁺ T-sejteket a recipienstől származó hematopoetikus APC-k (DC-k, B-sejtek, Langerhans sejtek) aktiválják, míg a CD4⁺ T-sejteket a recipiens nem hematopoetikus APC-i is képesek aktiválni a GI traktusban (53). Az antigének az MHC molekulákon keresztül prezentálódnak a T-sejteknek, és minél nagyobb az eltérés a donor és a recipiens között, annál nagyobb T-sejt válasszal kell számolnunk. Fontos látni, hogy már egy HLA génben való eltérés is szignifikáns választ vált ki, illetve, hogy még teljes MHC egyezés esetén sem marad el teljesen a T-sejtek aktivációja. Ennek oka, hogy a T-sejtek miHA eltéréseket, azaz a donor és a recipiens között eltérő egyéb, nem-MHC-jellegű, idegen antigéneket mindig felismernek. Allogén transzplantációban a kérdés tehát alapvetően nem az, hogy fellép-e szöveti összeférhetetlenség, lévén az mindig fellép, hanem inkább az, hogy ennek mekkora a mértéke, és milyen intenzív a rá adott válasz. E ponton meg kell jegyezni, hogy a T-sejtek sikeres aktivációjához az aGvHD kialakulása során jellemző citokin-viharban sem elegendő az MHC-n keresztüli antigén bemutatás, hanem szükség van kostimulációs szignálokra is. Ilyen kostimulációs szignál lehet a CD40/CD40L vagy CD28/B7 kapcsolat. A donor T-sejtek aktivációjukat követően osztódni kezdenek és differenciálódnak, majd IL-2-t és IFN γ -t szekretálnak. Az IL-2 támogatja a T-sejtek és NK-sejtek további allogén immunválaszát, míg az IFN γ szerepe

még nem teljesen tisztázott a folyamatban. Szerepe paradox, hiszen gátolja a GvHD kialakulását, miközben elősegíti a GvL hatást (55).

Végül elérkeztünk az effektor fázishoz, amely egy többszörösen összetett, celluláris és gyulladásos effektor komplex kaszkád, ami a gyulladás további fokozódásához és szövethárosodáshoz vezet. A T-sejtek kétféle módon, direkt és indirekt úton okoznak szövethárosodást. A T-sejtek direkt mechanizmusai a perforin és granzim dependens ölés, illetve CD95/CD95L-on keresztüli sejtpusztítás (56, 57). Az indirekt mechanizmusok közé tartozik a gyulladásos citokinek kibocsátása, amik további sejteket, fagocitákat és NK-sejteket toboroznak és aktiválnak. E sejtek lokális aktiválódásuk révén olyan további gyulladásos citokineket szekretálnak, mint például a $\text{TNF}\alpha$ és $\text{IFN}\gamma$, illetve gyulladásos komponenseket termelnek, mint a heparán-szulfát és hialuronán oligoszacharidok, amellyel szövethárosodást okoznak, és ezáltal fenntartják a folyamatos antigénstimulációt. Végül a károsodott szövetekből felszabaduló mediátorok, mint például a prosztaglandinok fájdalmat és lázat okoznak, a nitrogén-oxidok pedig értágító hatásúak, szabadgyökeik toxikusak, és tovább károsítják a szöveti környezetet. Az, hogy az akut GvHD-ben miért pontosan a bőr, a bélrendszer és a máj kiemelt fontosságú a szövethárosodás szempontjából, még nem igazán tisztázott, hiszen az alloantigének az egész szervezetben előfordulnak, így a sematikus logikát követve minden szervnek egyformán érintettnek kellene lennie. Esetleg a miHA-k szervenként eltérő expressziója, vagy MHC-n keresztüli szervenként eltérő hozzáférhetősége állhat az érintett szervek szűk, és jellegzetes spektrumának hátterében (58), ám ez is jórészt spekuláció, például az emberi szervezetben a legtöbb miHA széles körben expresszálódik (49). A folyamatot a **7. Ábra** foglalja össze.



7. Ábra: Az aGvHD patomechanizmusa és résztvevői, Forrás:(53)

2.2.1.1 Rizikófaktorok

Az aGvHD kialakulásának esélyét befolyásoló legfőbb tényezők a következők:

- HLA eltérések (rokon, illetve nem rokon donorok)
- Az életkor (betegé, illetve a beteg és donor közötti túl nagy eltérés, életkor okozta komorbiditás)
- A donor és a recipiens neme
- Női donor és férfi recipiens esetén a donor korábbi terhessége/terhességeinek száma
- Az alkalmazott aGvHD profilaxis
- Az őssejtforrás jellege (perifériás vér, csontvelő, köldökzsinór-vér)
- A kondicionálás típusa és intenzitása
- A donor és recipiens CMV státusza, EBV szeropozitivitás

Számos tanulmány próbált már világos válaszokat megfogalmazni arra a kérdésre, hogy vajon mely faktorok és milyen mértékben tudják befolyásolni az aGvHD kialakulását. Sajnos e tekintetben a mai napig nincs teljes konszenzus, melynek háttérében részben az is állhat, hogy a témában még az elemi kérdések tisztázása is sokáig váratott magára. Így például csak 2014-ben született megállapodás az akut és krónikus GvHD 100 napos limit alapján történő elkülönítésének eltörléséről (46).

Mindazonáltal történtek előrelépések is, például kimutatták, hogy az emelt dózisban alkalmazott graft, legalábbis köldökzsínór vérből származó összejek használata esetén, növeli az aGvHD kialakulásának kockázatát (59). Emellett ismert, hogy a nagyobb fokú HLA egyezés kevésbé súlyos aGvHD kialakulását vetíti előre (60). Végül, hogy a recipiens idősebb kora is rizikótényező, mely elősegíti a szövődményes aGvHD kialakulását. Az aGvHD megelőzésére alkalmazott profilaktikus terápia jellege sem lényegtelen, így a profilaxisként alkalmazott tacrolimus és MMF a súlyos aGvHD gyakoribb előfordulását okozta nem rokon donorok esetén (61), míg az anti-timocita globulin profilaxisként való alkalmazása kisebb mértékű GvHD előfordulást eredményezett a betegekben (62).

A nem szerepe is érdekes kérdés, melyre máig számos tanulmány fókuszál. Kimutatásra került, hogy az eltérő nemi kombinációk között a férfi recipiens és női donor (F→M) a legrosszabb alkalmazható kombináció, hiszen ekkor alakul ki legnagyobb számban GvHD és megnövekszik a nem relapszus okozta mortalitás (NRM) is. A folyamat hátterében a női donor graftjából származó T-sejtek állnak, melyek a számukra idegen, a férfi recipiens Y-kromoszómán kódolt minor hisztokompatibilitási antigénjeit felismerve azok ellen immunválaszt váltanak ki, így valószínűsíthetően emelve a GvHD mellett az NRM esetek számát is. Ezzel párhuzamosan az is leírásra került, hogy e kombináció alkalmazása esetén a legalacsonyabb a relapszusok száma, melynek hátterében ugyanezen minor hisztokompatibilitási antigének állnak, amelyek növelik a graft versus leukémia hatást, így csökkentve a relapszus kialakulásának kockázatát (63-65). Összességében azonban az F → M transzplantációk megnövekedett toxicitása csökkent túlélést eredményezett, így e donor/recipiens kombináció rizikó faktornak számít és transzplantációban nem alkalmazzák.

Ám eddig kevés tanulmány fókuszált a recipiens nemének kérdésére, illetve a további donor/recipiens kombinációkra. Érdekes, hogy férfi donor és férfi recipiens esetén (M → M) megnő a relapszusok száma. Ennek biológiai hátterére nem igazán adnak választ az Y kromoszómán található MiHA eltérések, hacsak nem magának az Y kromoszómának tulajdonítjuk ezt a hatást, melyet alátámaszthat az a tény, hogy az átlagos férfiak is rövidebb élettartammal számolhatnak, mint az átlagos nők. Ezen túlmenően összehasonlítva a női és férfi recipienseket, a donor nemétől függetlenül, azt láthatjuk, hogy a férfiak alacsonyabb teljes túléléssel és csökkent progresszió-mentes túléléssel

számolhatnak, mint a nők. Ezzel szemben a női recipiensek esetén a donor neme nem befolyásolja se a túlélést, se a relapszust, de még az NRM-t sem.

Összefoglalva tehát a nemnek szerepe van a beteg túlélésében, NRM és GvHD kialakulásában, melyre a férfiak érzékenyebbek, mint a nők, ám a gyakorlatban, minimalizálva ezt a rizikófaktort a legtöbbször nem-azonos transzplantációkat végeznek (66). Végül úgy tűnik, hogy a transzplantációt megelőző komorbiditások is hatással vannak az aGvHD előfordulási gyakoriságára, illetve súlyosságára. Tehát minél magasabb a komorbiditási index, annál magasabb akut GVHD incidenciával és súlyossággal számolhatunk (67). A rizikótényezők gondos felmérése és mérlegelése fontos támpont a helyes minőségű és dózisu profilaxis megválasztásakor. Természetesen a profilaxison túl a kondicionálás intenzitása, a TBI és az őssejtforrás együttese, kombinált hatásként jelentkezik az aGvHD kialakulásának kockázatában, ezért ezek kiválasztása és beállítása egyedileg, beteg-specifikusan történik.

2.2.1.2 Klinikai manifestáció

Az aGvHD-ra jellemző szövetkárosodás és klinikai tünetek leggyakrabban a bőrön, a májban, a gasztrointesztinális rendszerben, a nyálkahártyákon és ritkán a szemben jelentkeznek. Az aGvHD bármely formája járhat lázzal, mely esetében kórokozó jelenléte nem kimutatható, illetve a diagnózis legtöbbször kizáráson alapul.

Kután aGvHD esetében gyakori tünetek a tenyérről-talpról induló maculopapulosus kiütések, illetve erythrodemák, melyek befedhetik akár az egész testfelszínt, és akár toxikus epidermális nekrolízishez is vezethetnek. A maculopapulosus kiütéseket emellett fekélyek és bullák megjelenése is kiegészítheti. A klinikai kép értékelése során nehézséget jelent, hogy a bőrön jelentkező GvHDs tünetek kialakulhatnak az aHSCT-ben használatos gyógyszerek okozta allergiás reakciók, toxinok, mikroorganizmusok illetve az alkalmazott kemo- avagy rádióterápia következtében is, amit mindig szem előtt kell tartani, ezért a helyes diagnózis felállításához akár biopsziákra is szükség lehet.

A GI aGvHD esetén a legjellemzőbb tünetek a hasmenés, hányás, étvágytalanság, fogyás és hasi fájdalom megjelenése. A diarrhoea súlyos GI aGvHD esetén extrém méreteket is ölthet, a beteg székletmennyisége akár több mint 10L/nap-ot is elérheti, amit fekélyek kialakulása kísér. Természetesen, mint a bőr esetében láttuk, itt is számolni kell a kemoterápia és a gyógyszerek hatásával, illetve a különböző belfertőzésekkel, melyek

hasonló tüneteket produkálhatnak. Ugyan ritkán kerül alkalmazásra, de a bél-biopszia vagy a képalkotó vizsgálatok itt is segíthetik a helyes diagnózis felállítását.

Végül a májat érintő aGvHD esetén a sárgaság megjelenése az egyik fő tünet. A betegség során megemelkedik a bilirubin, ALP, γ GT, ALAT és az összkoleszterin, koagulopátia és hiperammonémia léphet fel. A diagnózis felállítása során értelemszerűen itt is ki kell zárni az aGvHD-tól független magyarázatokat, úgymint májbetegség, vírusfertőzés, gyógyszer mellékhatás avagy szepszis. A hisztopatológiai lelet leírja a periportalis infiltrációt, az epeutak és az endothél gyulladását, destrukcióját, de a gyakorlatban, a gyakori vérzéses szövődményekre tekintettel, ritkán kerül sor diagnosztikus céllal végrehajtott májbiopsziára.

2.2.1.3 Staging és Grading

Az aGvHD további kategorizáláshoz a tünetek súlyossága alapján különböző osztályozási rendszereket (grading) állítottak fel. Az első ilyen kritériumrendszer a Glucksberg grade, mely 1974-ben készült, és amelyben az érintett szervet a károsodás mértéke szerint 1-4-ig osztályozták (staging), majd a szervenként kapott értékeket egy I-IV-ig terjedő skálába (grading) integrálták (47). Az osztályozás alapját képezte a maculopapulosus kiütések megléte és kiterjedése, az erythroderma megléte, a szérumbilirubin értéke és a széklet mennyisége. Az évek során ez az osztályozási rendszer többször is átdolgozásra került, tovább finomítva a tünetek besorolását (68, 69). A frissített staging és grading rendszert a **4-5. Táblázat** mutatja be. (Forrás: UpToDate honlap és (70))

4-5. Táblázat: Glucksberg staging és grading az aGvHD-ban

Stage	Alsó és felső GI traktus (ml/nap)	Máj (bilirubin mg/dl)	Bőr (kiütés % a teljes testfelszínen)
1	Hasmenés>500	2-3	<25%
2	Hasmenés >1000	3.1-6	25-50%
3	Hasmenés >1500	6.1-15	Általános erythroderma
4	Hasmenés >2000 vagy súlyos hasi fájdalom ileusszal vagy anélkül	>15	Általános erythroderma Bullák/hámlás

Glucksberg grade	
I	Stage 1-2 bőr érintettség, máj és bél érintettség nélkül
II	Stage 1-3 bőr érintettség, Stage 1 máj és/vagy bél érintettséggel
III	Stage 2 vagy 3 bőr érintettség, máj vagy bél érintettséggel
IV	Stage 1-4 bőr érintettség, Stage 2-4 máj vagy bél érintettség

Egy másik gyakran alkalmazott osztályozási kritériumrendszer a Nemzetközi Csontvelőtranszplantációs Regiszter (IBMTR) által lett definiálva (70). A súlyossági fokozatai A-D-ig terjednek, melynek részleteit a **6. Táblázat** mutatja be (70).

6. Táblázat: Az IBMTR osztályozási rendszere

Az index értéke	Bőr érintettsége		Máj érintettsége		GI traktus érintettsége	
	Stádium	A kiütés kiterjedése	Stádium	Össz bilirubin (μ M)	Stádium	A széklet mennyisége (ml/ nap)
A	1	< 25%	0	< 34	0	< 500
B	2	25- 50%	1-2	34-102	1-2	550-1500
C	3	> 50%	3	103-255	3	> 1500
D	4	bullózus	4	> 255	4	komoly fájdalom, ileus
Adott indexértéken belül elég egy kritériumnak érvényesülnie. A legnagyobb érvényes kritérium határozza meg az index értékét.						

Arról, hogy e két rendszer közül melyik korrelál jobban a prognózissal, több metaanalízis is készült (71, 72), amelyek konklúziója annyi, hogy a korai mortalitást jobban előre jelezni látszik a módosított Glucksberg grade rendszer, azonban a teljes mortalitás előrejelzésében nincs közöttük érdemi különbség. Manapság a grading rendszerek mellett a plazma biomarker panelek is használatba kerültek, mint például az IL-2R α , TNFR1, IL-8 és a hepatocita növekedési faktor, melyek viszonylag nagy szenzitivitással, de általában korlátozottabb specificitással jellemezhetőek, és megerősíthetik az aGvHD diagnózist (73). A diagnosztikus és prognosztikus plazma biomarkerek kutatása jelenleg is forró kutatási területnek tekinthető, ugyanis erős a remény, hogy ezek segítségével a jövőben az aGvHD előrejelzése, felismerése és ezáltal talán a kezelhetősége is jelentősen javulni fog (74).

2.2.1.4 Profilaxis

Mivel a mai napig nem áll rendelkezésre olyan standardizált prognosztikus marker vagy kritériumrendszer, melynek segítségével megjósolhatnánk az aGvHD kialakulását és súlyosságát, a betegség kialakulását megelőzendő valamennyi aHSCT-n átesett páciens a protokoll részeként megelőző kezelésben, GvHD profilaxisban részesül. Mivel az aGvHD gerincét a graft kiváltotta immunválasz, illetve a fokozott T-sejt aktivitás adja, a profilaxis jelenleg, farmakológiai módon és/vagy T-sejt-mentesítés révén elért immunszuppresszió illetve T-sejt-gátláson alapszik. A T-sejt-mentesítést már részlegesen érintettük, utalva arra, hogy a T-sejtek teljes depléciójával kiküszöbölhető ugyan az aGvHD kialakulása, azonban ez a beavatkozás a Treg-ek hiánya miatt egyben graft megtapadási problémákat, az érett Th és CTL sejtek elmaradása miatt pedig lassabb T-sejtes immunrekonstrukciót és a teljes GvL effektus elmaradását vonja maga után, ami miatt megnő az alapbetegség relapszusának a kockázata.

A T-sejtes immunitás rekonstrukciója főleg felnőttekben kitüntetett, hiszen bennük már csak csökkent tímikus aktivitással számolhatunk, így a T-sejtek hiányában az infekciók aránya is növekszik. A profilaktikus célra leggyakrabban alkalmazott gyógyszeres immunszuppressziós stratégiákat a **7. Táblázat** foglalja össze.

7. Táblázat: Stratégiák az aGvHD megelőzésére. Forrás: (75)

Gyógyszer	Dózis	Időtartam	Toxicitás
Kezelés I: Kalcineurin inhibitor + Methotrexát			
Ciklosporin	3mg/kg/nap, egy nappal graft beadása előtt	aGvHD kialakulás nélkül 6 hónap és a 3. hónaptól csökkenthető	Neurológiai problémák, veseelégtelenség, mikroangiopátia
Methotrexát	15mg/m2 egy nappal graft beadása után, 10mg/m2 transzplantációt követő 3, 6 és 11. napon	BMT + 1,3,6 és 11. napokon	Későbbi hematológiai helyreállítás, GI nyálkahártya toxicitás, máj toxicitás, vesetoxicitás
Tacrolimus	0,02mg/kg/nap	BMT -3-tól BMT -1-ig	Veseelégtelenség, megnöött bilirubin érték, neorotoxicitás, magas vérnyomás, vércukorszint emelkedés
Kezelés II: MMF + Kalcineurin inhibitor			
MMF	30mg/kg/nap, két dózisban	Naponta BMT +1 után testvér donor esetén egy hónapig, nem testvér donor esetén 3 hónapig.	Növekedett vírusfertőzés szám, trombocitopénia, leukopénia,
Ciklosporin	Orálisan: 12mg/kg/nap	BMT-1: dupla dózis 12 óránként	Vese elégtelenség, Mikroangiopátia

A máig leggyakrabban alkalmazott kombináció az elsőként 1986-ban bevezetett kalcineurin inhibitor (ciklosporin vagy tacrolimus) profilaxis, rövid ideig tartó methotrexát kezeléssel kiegészítve, mely kompetitíven gátolja a dihidrofolát reduktázt, és ezen keresztül a *de novo* folátképződést, és így módon főként a T-sejtek osztódását. A methotrexát-kezelés relatíve szelektív hatásának az az oka, hogy a limfociták más emberi sejtekkel szemben szinte teljes mértékben *de novo* nukleotid-szintézisre vannak berendezkedve (76).

Számos tanulmány vizsgálta ezen készítmények hatását önmagában, de az aGvHD kivédésére a kombinációs alkalmazás bizonyult a leghatásosabbnak (77). A methotrexát érzékeny betegek esetében van lehetőség a methotrexátot kortikoszteroiddal helyettesíteni és így csökkenteni az aGvHD kialakulásának kockázatát. Az általános profilaxis gerincét tehát a kalcineurin inhibitorok és a methotrexát, vagy methotrexát helyett a szintén purin bioszintézist gátló MMF adja, habár az utóbbi években a sirolimus, amely egy mTOR inhibitor, is kiegészíti a kezelést.

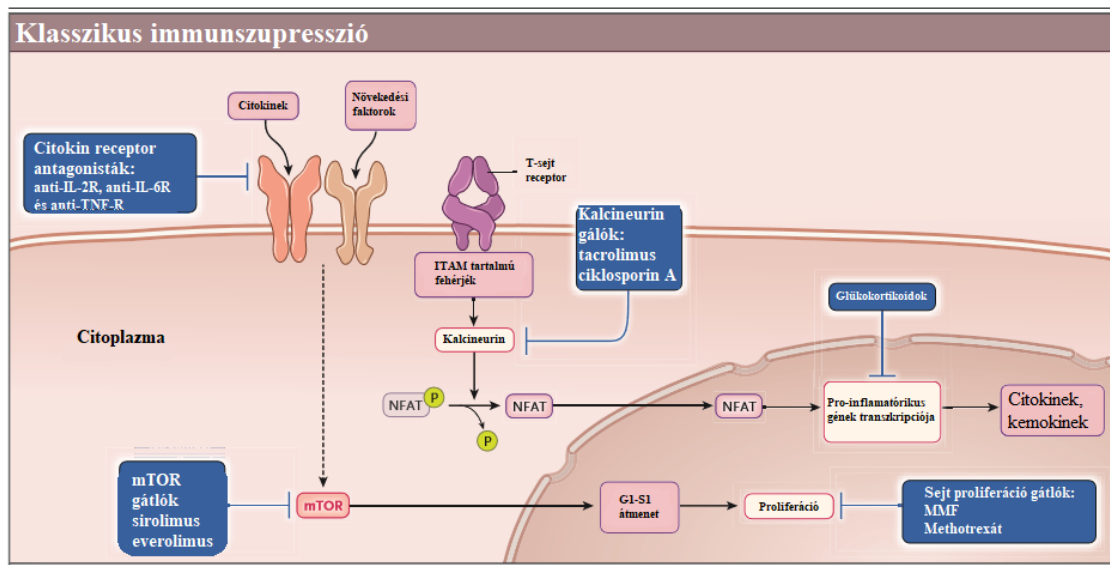
A profilaxis kiegészítése sirolimussal egyes adatok szerint talán segíti a graft gyorsabb megtapadását és csökkenti a mucositis, de a túlélésre nincs hatása. Más tanulmányok alapján úgy tűnik, hogy a sirolimus egyedül RIC aHSCT esetén tudta növelni a túlélést, így ilyen típusú transzplantációk esetén lehet aGvHD-prevenációs jelentősége (78). Számos tanulmány fókuszál a kalcineurin inhibitor mellett adott methotrexát dózisának csökkentésére vagy MMF-el való helyettesítésére. Kimutatták, hogy az MMF adása csökkent mukozitisszel és gyorsabb neutrofil megtapadással járt, mint a methotrexát esetében (79). A fentiek mellett ma már a standard profilaxis részét képezhetik még a citokin receptor antagonisták, mint például az anti-IL-2R vagy az anti-TNFR is.

E két lehetőség közül talán az IL-2 blokádnak rendelkezik a legnagyobb irodalommal; sokáig az aGvHD szempontjából elsődleges citokinnek számított, hiszen a T-sejtek autokrin növekedési faktora, így hozzájárul a GvHD-ra jellemző szövetkárosodáshoz, ám a profilaktikus ciklosporin segítségével gátolható. Több tanulmány is kimutatta, hogy az IL-2-öt termelő prekursor T-sejtek száma egyenes arányban van a GvHD előfordulásával és ezen sejtek a transzplantációt követő 20. naptól már mérhetőek, így jelezhetik a GvHD akár korai kialakulását is.

Az IL-2-vel szemben a TNF- α indirekt és direkt módon is szerepet játszik az aGvHD-ban. Indirekt módon a T-sejteket és azok proliferációját támogatja, így hozzájárul a szövetkárosító mechanizmushoz, illetve direkt módon a károsodott szövetben apoptózist indukál (80). Az IL-2-höz hasonlóan a TNF- α emelkedett mennyisége is egyenes arányosságot mutat az egyre súlyosabb GvHD kialakulással. Ezen túlmenően a kondicionálás ideje alatt az emelkedett TNF- α plazma szint nem csak a GvHD kialakulást és súlyosságot prediktálta, hanem 30% alatti teljes túléléssel is asszociált (81).

A klasszikus profilaxist kiegészítő új elképzelés emellett a ciklofoszfamid poszt-transzplantációs alkalmazása. Kimutatták, hogy a ciklofoszfamid használata biztonságos, nem okoz apláziát, illetve a T-sejtekben tolerancia indukálása révén csökkenti az aGvHD kialakulását. Kombinált adása ciklosporinnal, MAC mellett végrehajtott, HLA-azonos aHSCT esetén pedig csökkentette az aGvHD kialakulását, illetve viszonylag alacsony GVHD előfordulást eredményezett még a haploidentikus transzplantációk esetében is (82).

Végül a legújabb profilaktikus stratégia pedig a mezenchimális őssejtek alkalmazása az aGvHD kiküszöbölésére. A mezenchimális őssejtek erős immunszuppresszív hatást fejtenek ki az alloreaktív T-sejtekre (83) és jelenleg is számos klinikai fázisban tartó mezenchimális készítmény tesztelése folyik, melyek igen biztató eredményekkel kecsegtetnek, miszerint alkalmazásukkal kivédhető az aGvHD kialakulása. Végül meg kell jegyeznünk, hogy számos tanulmány egybehangzó álláspontja szerint a kortikoszteroidok alkalmazásának a profilaxisban nincs helye, a szteroidoknak nincs számottevő profilaktikus hatása. A profilaktikusan alkalmazott immunszuppresszív kezelés célpontjait és mechanizmusát a **8. Ábra** mutatja be részletesen.



8. Ábra: Az aGvHD profilaxisában és kezelésében leggyakrabban használt immunszuppresszív hatóanyagok és támadáspontjaik. Forrás:(82)

2.2.1.5 Terápia

A profilaxis megfelelő megválasztása ugyan jelentősen csökkenti az aGvHD kialakulásának kockázatát, azonban, mint azt fentebb már említettük, a betegség kialakulása még mindig nagyszámú pácienset érint. Az aGvHD diagnózisa után a terápia kiválasztását erősen befolyásolják a grade, a szervi érintettség, a lehetséges kezelési opciók elérhetősége, költségei, a páciens és a kezelőorvos személye.

A Grade I a legenyhébb aGvHD forma, mely a legtöbbször csak helyi kezelést és profilaktikusan adott calcineurin inhibítort igényel. Viszkető bőr esetén a kezelés kiegészíthető antihisztaminok adásával, off-label pedig helyileg alkalmazott tacrolimus adható a szteroidrezisztens bőrjelenségekre. Szisztémás immunszuppresszió nem javallott.

Grade II-IV esetekben, melyek már súlyosabb aGvHD formák, megkülönböztetünk első-, másod- és harmadvonalbeli kezelést. Elsővonalon ajánlott a calcineurin gátlók használata. Ha már profilaxisként alkalmazásra kerültek ezek a szerek, akkor azok dózisának emelése történik, mint elsővonalonbeli kezelés. Neurotoxicitás esetén megfontolandó a ciklosporin helyettesítése tacrolimussal (84).

A kortikoszteroidra, amely a standard aGvHD kezelés kiemelt eleme, általában a betegek 40-50 %-a reagál. Grade II-ben 1 mg/ttkg, ennél súlyosabb aGvHD-ban 2 mg/ttkg metilprednizolon intravénás adása bizonyult hatásosnak (85), míg a dózis további

emelése már nem jár terápiás előnnyel. Ötnapos szteroid kezelés elegendő ahhoz, hogy a beteg besorolható legyen a szteroid kezelésre reagáló, avagy szteroidrezisztens csoportba (86). Sajnos a szteroidrefrakter csoport kezelése a mai napig problémás, és ezek a betegek igen rossz hosszútávú túléléssel számolhatnak (87). A bél érintettsége esetén előtérbe kerülnek a nem felszívódó szteroidok, úgymint a budezonid és a beclometazon, hiszen így csökkenthetők a *per os* alkalmazott készítmények alkalmazása során fellépő szisztémás mellékhatások. A fenti kezelések egymással történő kombinálása, avagy súlyos tünetek megjelenése esetén másodvonalbeli módszerek alkalmazása szükséges.

Az egyik ilyen módszer az extracorporalis photopheresis (ECP), mely során a beteg véréből származó leukocitákat 8-methoxypsoralennel és UVA besugárzással kezelik mielőtt azok visszakerülnének a keringésbe. A kezelés hatására 24 órán belül nem csak az aktivált T-sejtek, de mindenfajta fehérvérsejt apoptózisa is bekövetkezik. Sajnos az ECP pontos hatásmechanizmusa továbbra sem ismert (88).

További másodvonalbeli terápiás célpont a $TNF\alpha$, mely az afferens fázis egyik legfontosabb szereplője, részt vesz az APC-ek aktiválásában, az effektor sejtek toborzásában, és a direkt és indirekt szövetkárosításban is (89), így blokkolása az aGvHD kezelésére is lehetséges alternatíva. A két leggyakrabban használt biológiai terápia a $TNF\alpha$ blokkolására az infliximab, mely egy anti- $TNF\alpha$ monoklonális antitest, illetve az etanercept, mely egy szolubilis dimer $TNF\alpha$ receptor 2-IgG Fc fúziós protein. A tapasztalatok szerint a gasztrointesztinális traktust érintő aGvHD különösen hatékonyan kezelhető TNF blokáddal (90).

Az mTOR gátló sirolimus szintén másodvonalbeli terápia, azonban a hemolitikus urémiás szindróma kockázata és a hiperlipidémiát okozó hatása miatt csak óvatosan alkalmazható. A profilaxis mellett második vonalbeli szerként is használható az MMF, mely tehát főként a T és B-sejtekre hat, de általánosságban az összes osztódó sejtet gátolja valamelyest. Végül meg kell említeni az egér inolimomab, és a basiliximab kiméra monoklonális antitesteket, melyek mindketten az IL-2 receptor α alegységét targetálják, ami főként az aktivált T-sejtek felszínén található meg.

Általában két másodvonalbeli készítmény hatástalansága esetén kerülhet sor harmadik vonalbeli terápia alkalmazására. Ilyen harmadik vonalbeli monoklonális antitest az alemtuzumab, mely a CD52-t targetálja és az érett T és B sejteket, monocitákat,

makrofágokat és eozinofil granulocitákat célozza (91). Emellett methotrexat és mezenchimális őssejtek nemcsak profilaktikus, hanem harmadik vonalbeli terápiás ágensként is használhatók. Szintén itt említendő a pentostatin nukleozid analóg, mely az adenozin-deaminázt gátolja, így hatására toxikus metabolitok halmozódnak fel, amelyet a T-és NK-sejtek pusztulása követ. Egyéb terápiás ágensek, melyek még szerepet játszhatnak az aGvHD harmadik vonalbeli terápiájában az antitimocita-globulin, valamint a CD4⁺/CD25^{high}/CD127^{low} regulátoros T-sejtek adoptív transzfere (92, 93)

2.3 Fejlesztés alatt álló és vizsgálati szakban lévő terápiák

Az utóbbi évek kutatásai a relapszus csökkentésére és a GvHD megelőzésére fókuszáltak, például a graft immunaktivitásának GvH helyett GvL irányba történő eltolásával, manipulálásával. A GvL folyamatában a főszerepet a donor eredetű T-sejtek maradvány vagy relapszusos leukémiás sejtekkel szembeni immunválasza és az ezt kiegészítő NK-sejtek és B-sejtek aktivitása játssza, melyek kiváló célpontjai a legújabb terápiáknak. A következőkben olyan stratégiákról lesz szó melyek már legalább elérték a klinikai vizsgálati fázist.

2.3.1 NK-sejt adoptív transzferes immunterápia

Az aHSCt-t követően az érett, funkcióképes NK-sejtek csak a graft differenciálódását követően, néhány héttel a transzplantáció után jelennek meg a betegekben. Ez azt jelenti, hogy az első pár hétben a kevésbé funkcióképes, éretlen NK-sejtek dominálnak, amelyek nem képesek részt venni a GvL hatás kialakításában. Egy fázis II-ben lévő klinikai vizsgálat most ezen érett NK-sejtek pótlását teszteli donor NK-sejt infúzió adásával a transzplantációt követő 4, 30 és 100. napokon. Természetesen a vizsgálat célja a graft jobb megtapadásának elérése és a GvL hatás növelése (94). Sajnos ez a vizsgálat egyelőre nem hozott áttörést a graft megtapadásának vagy a relapszus megelőzésének szempontjából. A kezelés megvalósítható és biztonságos, ám valószínűleg a beadott NK-sejtek dózisének módosításával, esetleges előaktiválásával vagy beadásának időzítésével javítható lenne a kezelés.

2.3.2 Anti-tumor vakcináció

Régi koncepció a transzplantáció során olyan autológ T-sejtek visszaadása, adoptív transzfere, amelyeket a betegben megtalálható daganatsejtek egésze, vagy csak egyes specifikus antigénjei ellen aktiválnak. Számos ilyen vizsgálat történt, többek között

AML-ben (Wilms tumor asszociált antigén elleni immunizálás), CML-ben (BCR/ABL peptid epitópok használata) vagy mielóma multiplexben (dendritikus/mielóma fúziós sejt használata). (95, 96). Más vizsgálatok során a beteg inaktivált, autológ leukémia sejt transzfúziót kapott az aHSCT-t követően, hogy ezzel fokozzák az *in vivo* immunitást. A módszer biztonságosnak és immunogénnek mutatkozik, még immunszuppresszív GvHD profilaxis mellett is (97, 98), ám talán előnyösebb volna egy egészséges donor, egészséges sejtjeit használni, mint a beteg sejtjeit, melyek számos esetben már toleránsak a daganatsejtek kulcsantigénjeivel szemben, illetve már csak gyenge effektorválaszok kiváltására képesek a megelőző kemoterápiás kezelések miatt. Ezt a logikát követve kis betegcsoporton már tesztelték olyan eljárást, amelyben először az egészséges donort vakcinálták a beteg mielóma fehérjéivel, majd ezt követően immobilizálták őssejtjeit, majd így történt meg a graft begyűjtése az aHSCT számára. Az elsődleges eredmények szerint a recipiensnek történő beadást követően a betegben megtörtént az immunválasz és hosszútávú remisszió alakult ki (99, 100). Sajnos az eljárás legfőbb limitációja továbbra is a donor vakcinálása. Ez kiváltható lenne a donor sejtjeinek *ex vivo* priming-jával és expansiójával tumor asszociált antigének jelenlétében, ám ez a procedura egyelőre még mindig nagyon drágának számít.

2.3.3 Monoklonális antitest terápia

Manapság a monoklonális antitestek a terápiás rutin részét képezik számos hematológiai rosszindulatú daganat esetében. Például a rituximab, amely egy anti-CD20 monoklonális ellenanyag, a B-sejt limfómák standard kezelési protokolljának része, míg a gemtuzumab ozogamicin, amely egy toxinnal konjugált anti-CD33 monoklonális ellenanyag, az AML-ben szenvedő betegek teljes túlélését javítja, alacsony dózisú kemoterápia mellett alkalmazva (101).

Ezen túlmenően számos preklinikai és klinikai vizsgálat fókuszál a bispecifikus ellenanyagok vizsgálatára. A bispecifikus ellenanyagok legnagyobb előnye, hogy akár 3 különbözőféle sejtet (például: APC-Tumor-T-sejt) képesek fizikálisan közel hozni egymáshoz, ezzel biztosítva a még erőteljesebb effektor funkció kialakulását, vagyis a tumorsejt lízisét. Több bispecifikus ellenanyag tesztelése is történik jelenleg, mint például a blinatumomab, amely egy CD3/CD19 bispecifikus egér ellenanyag, melyet eddig relapszusban és prekursor B-sejtes akut limfoblasztos leukémiában próbáltak ki (102).

Preklinikai AML vizsgálatokban pedig egy CD3/CD33 bispecifikus ellenanyag hozott kiváló eredményeket (103).

Az elmúlt pár év pedig a szteroid-rezisztens aGvHD-ban szenvedő betegek kezelésére fókuszált. Ilyen ellenanyag-terápiák voltak a ruxolitnib (JAK inhibitor), mely már multicenter vizsgálatoknál jár (104), a tocilizumab (IL-6R antagonist), amely atlizumab néven is ismeretes és eddig rheumatoid arthritis és juvenilis idiopathias arthritis kezelésére használták (105), illetve a begelomab (anti-CD26) melynek tesztelése jelenleg fázisI/II-ben tart (106). Természetesen ezen pár kiragadott terápián túl számos ellenanyag áll tesztelés alatt főleg AML esetében, melyek közül néhány várhatóan a rutin kezelés részévé válhat.(107).

2.3.4 Regulatórikus T-sejt infúzió

A teljes értékű T-sejt aktiváció és regulatórikus T-sejt mediált szuppresszió egyensúlya a GvHD kialakulása szempontjából kritikus jelentőségű. A szuppresszív regulatórikus folyamatok legfőbb szabályozói a Foxp3+/CD4+/CD25^{high}/CD127^{low} regulatórikus Treg sejtek, melyek képesek gátolni a CD4+-és CD8+ T-sejtek aktivációját, lerövidíteni azok életidejét, vagy akár a pusztulásukat is kiváltani, mind közvetlenül, mind azok APC-in keresztül. Ezekben a folyamatokban különböző szinten ható gátló fehérjék vesznek részt, amelyek mind az aGvHD elkerülése, mind a csontvelői graft megtapadásának elősegítése, azaz a kilökődés elkerülése szempontjából kiemelt szerepet kapnak.

Ilyen az aHSCT-ben fontos regulatórikus molekulák például: a citotoxikus T-limfocita-asszociált antigén-4 (CTLA-4), anti-limfocita funkcióhoz kötött antigén-1 (anti-LFA-1) vagy az anti-CD40-ligand (anti-CD40L).

A Treg sejtek terápiás alkalmazására különösen a haploidentikus transzplantációs forma nyújt lehetőséget; a betegek 95%-a számára biztosít gyorsan elérhető donort, ám sajnos a gyors donorforrás ára a nagyfokú HLA eltérésekből adódóan a gyakori graft megtapadási problémák és az infekciók megjelenése. E probléma kivédésére ígéretes stratégia lehet a graft Treg: Teff arányának beállítása (a Treg sejtek emelkedett száma a graft-ban gátolja az aGvHD kialakulását (108)). Számos futó kísérlet mutat biztató eredményeket, miszerint a Treg-ek alkalmazása az egyedüli GvHD profilaxis, amely a GvL hatást nem befolyásolja, nem emeli a relapszus kialakulásának esélyét, miközben elősegíti az immunológiai rekonstrukciót [118].

2.3.5 A graft $\alpha\beta$ T-sejt depléciója

A T-sejtek 95%-a $\alpha\beta$ láncokat hordozó T-sejt receptorral rendelkezik, mely sejtek főszereplői az aGvHD kialakulásának. Velük szemben a $\gamma\delta$ T-sejtek, amelyeket veleszületett-szerű vagy tranzícionális T-sejteknek is nevezünk, csupán a keringő T-sejtek 5%-t teszik ki, és MHC-független, nem specifikus antigénfelismerést végeznek, ugyanakkor képesek számos gyakori kórokozó és szövetkárosodás felismerésére és elhárítására. A $\gamma\delta$ T-sejtek aktivációs útvonalainak jellegzetességei a legtöbb vélemény szerint kizárják, hogy ezek a sejtek részt vegyenek az aGvHD kialakításában, ugyanakkor e sejtek képesek lennének valamiféle, ha nem is az $\alpha\beta$ T-sejtekével összemérhető hatékonyságú, de mégis releváns T-sejtes immunitás biztosítására a kezelés után immunszuprimált betegekben.

A kezelési stratégia ezeket figyelembe véve azon a rendkívül egyszerű koncepción alapul, hogy a graftot mentesítik az $\alpha\beta$ T-sejtektől, és csak $\gamma\delta$ T-sejteket tartalmazó graftot transzplantálnak anélkül, hogy bármilyen egyéb profilaktikus kezelést alkalmaznának. Számos klinikai vizsgálat bizonyította, hogy az ilyen graft alkalmazása mellett nincs graft megtapadási probléma és gyors immunrekonstrukció figyelhető meg, illetve az akut- és krónikus GvHD előfordulása is igen alacsony. Sajnos még nem rendelkezünk túl hosszú beteg követési eredményekkel, így a betegek túlélési esélyeinek vizsgálata még várat magára.

2.3.6 Allo-reaktív T-sejtek szelektív depléciója

Mint ahogyan azt már említettük, a T-sejtek teljes depléciója a graftból ugyan megszünteti a GvHD kialakulását, azonban nagymértékű graft megtapadási problémákat, infekciókat okoz, illetve gyakori relapsushoz vezet. A GvHD kialakulásában a főszerepet az alloreaktív T-sejtek játsszák, így intuitív a várakozás, hogy ezen sejtek szelektív depléciója szignifikánsan csökkenthetné a GvHD kialakulásának esélyét, miközben a GvL hatást és az immunológiai rekonstrukciót érintetlenül hagyná. Mindehhez első lépésben a beteg perifériás vér mononukleáris sejtjeit (PBMC-it), vagy T-sejtjeit leukoferezis segítségével gyűjtik. Ezt követően *ex vivo* kultúrában expandálják őket IL-2 és a CD3-at aktiváló muromonab-CD3 antitestek jelenlétében, majd besugárzás segítségével inaktíválják őket. Az így kezelt T-sejteket, mint aktiválódásra képtelen célsejteket (csalísejtek) használják azoknak a donor T-sejteknek a bekapcsolására, amelyek autoreaktívak. Az eljárás során először 1:1 arányú kokultúrában tartják a

recipienstől származó csali T-sejteket a graft potenciálisan alloreaktív T-sejtjeivel. Az alloreaktív T-sejtek aktiválódnak, igazából egy kevert limfocita reakció történik, majd az aktiválódott alloreaktív T-sejtek deplécióját megfelelő antitestek mágneses szeparálás vagy fotoferezis segítségével érik el. Ezt követően a donor perifériás véréből őssejteket gyűjtenek és az így kapott graftot T-sejt mentesítik. A transzplantáció napján a T-sejt-mentesített graft mellé adják az alloreaktív T-sejt depletált donor T-sejteket, így biztosítva az egyidejű GvL hatást és GvHD megelőzését. Sajnos csak kevés klinikai vizsgálatot végeztek a módszer igazolására, ami egyelőre igen fáradtságos és költséges eljárás, illetve nehéz GMP-kompatibilisen elvégezni (2).

2.3.7 Anti-virális citotoxikus sejtvonalak használata

Az immunszuprimált betegben reaktiválódó látens vírusfertőzések, vagy a környezetből érkező virális kórokozók a transzplantációs morbiditás és mortalitás jelentős kontribútorai, különösen gyermekkorú betegek, T-sejt-depletált, köldökzsínór vér őssejtforrás és haploidentikus egyezés esetén. Az anti-virális immunitás folyamatos fenntartására, helyreállítására vírus-reaktív T-sejtek adoptív transzferét használják már több mint egy évtizede, mely rendkívül sikeresnek bizonyult citomegalovírus, Epstein-Barr vírus és adenovírus infekció elkerülésére egyaránt.

2.3.8 Kiméra antigén receptorokat hordozó T-sejtek

A kiméra antigén receptorok (CARs) olyan rekombináns receptorok, amelyek egy natív tumorantigént felismerni képes B-sejt receptor scFv elem (a receptor varriábilis régiójának egyik lánc, single-chain fragment variable) és egy vagy több TCR komplexbe tartozó jelátvivő (CD3) illetve kostimulációs molekula domén (CD28, 4-1BBL, stb.) génfúzióval létrehozott, összetett komplexei.

Ezek a receptorok T-sejtekbe ültetve a B- és T-sejt receptorok funkcióit képesek biztosítani egyidőben, a kétféle receptor előnyeit elegyítve, azaz B-sejt szerűen, MHC-független, antigén prezentációt nem igénylő módon képesek daganatspecifikus T-sejteket bekapcsolni egy daganat közelében. Ezen receptorok beépítéséhez stabil T-sejt expenziót és gén transzdukciót kell biztosítani, de ezek megléte esetén elvben bármilyen sejtfelszíni daganat-specifikus molekula targetálható. A normál T-sejt receptorokkal szemben a CAR változat nem igényel MHC-n keresztüli antigén prezentálást, így nincs szükség egyező (matched) haplotípusra sem. Ezen túlmenően ezek a módosított receptorok képesek

érzékelni azokat a tumor sejteket is, amelyek immun-eváziós célból csak erősen csökkentett mértékű HLA expressziót tartanak fent (109).

A CAR T-sejtekből ráadásul az eredeti TCR akár Crispr-Cas9 technikával kiüthető; így az ilyen sejtek elvben semmiféle MHC vagy miHA mismatchre sem lesznek érzékenyek, ezért reális esély nyílhat arra, hogy ez a terápia nem csak hatékony GvL választ adjon, de egyben az aGvHD kialakulásának esélyét is a nullára redukálja. Jelenleg a leginkább kutatott célpontok a CD19+ B-sejtek és azok okozta megbetegedések, mint például a B-sejtes non-Hodgkin limfóma vagy a prekursor B-sejtes akut limfoblasztos leukémia, illetve a CD123+ AML sejtek (110, 111). Egyelőre úgy tűnik, hogy e kiméra receptorokat tartalmazó T-sejtek adoptív terápiája nagyszerű lehetőségeket rejt magában, és már több CAR-T-sejt alapú terápia is engedélyezésre került.

2.4 Az egér experimentális aGvHD modellek jelentősége a kutatásban

A különböző állatmodellek, és ezek közül is kitüntetetten az egér modellek mindig is fontos szerepet játszottak a GvHD patofiziológiájának megértésében. Megjegyzendő, hogy már az első humán allogén transzplantációt jóval megelőzően is végeztek aHST-t egérmodelleken. Az egérmodellek hozzájárulása a betegség immunológiai mechanizmusának felderítéséhez, az antigén prezentáció- és felismerés folyamatának feltárásához, a betegség két jellemző formájának, az akut és krónikus GvHD-nak az egymástól való elkülönítéséhez, és számos terápiás lehetőség preklinikai vizsgálatához egyaránt alapvető jelentőséggel bír (49).

Egérben az első allogén hematopoetikus őssejt-transzplantációt van Bekkum és De Vries hajtotta végre, besugárzott egereken, kevert csontvelői- és lép sejt grafttal. Igaz a transzplantáció sikeres volt, azaz az egerek felgyógyultak a sugárbetegségből és a csontvelő apláziából, ám a másodlagos betegségek, mint a testsúlycsökkenés, hasmenés, megváltozott bőr stb. letálisnak bizonyultak. Ez az akkor még másodlagos betegség elnevezés a ma ismert aGvHD-t takarta.

További, egérmodellekben végrehajtott vizsgálatokban megállapításra került, hogy az aGvHD kialakulásához 3 fontos kriterium teljesülése szükséges, melyek közül az elsőt Bilingham 1966-67 között határozta meg, miszerint az aGvHD kialakulásához immunológiailag kompetens, ma már tudjuk, hogy érett T-sejtek, szükségesek. 1986-87 táján a klinikumban és kísérletesen is bizonyítást nyert, hogy az aGvHD súlyossága

korrelál ezen sejtek számával, tehát minél több ilyen sejt található a graftban annál nagyobb az aGvHD előfordulása és az egyre súlyosabb formák kialakulása (112, 113). A második fontos, egérmodellben azonosított kritérium az volt, hogy a recipiensnek be kell tudnia fogadni a kapott graftot, tehát immunhiányos állapotban kell lennie a graft beadásakor. Egészséges immunkompetens recipiensek transzplantációja ugyanis mindig a graft kilökődésével végződött. Ezt az immunhiányos vagy immunszuprimált állapotot a legtöbbször sugárkezeléssel vagy kemoterápiás szerek alkalmazásával érhetjük el. Harmadszor pedig felismerték a recipiensben és a donorban lévő major és minor hisztokompatibilitási antigének fontosságát (114).

Az egereken végzett vizsgálatok nagy előnye, hogy nagyon pontosan, nagy számban és reprodukálhatóan tesztelhetjük a különböző gyógyszerjelölteket és a különböző befolyásoló faktorokat. Ezzel együtt azonban, mint minden modell szervezet, az egér modellek sem reprezentálják tökéletesen a modellezett emberi kórképet, és kétségkívül mutatnak bizonyos eltéréseket tőle (115, 116).

2.4.1 Az aGvHD egérmodelljeinek erősségei és korlátai

Mint minden állatmodellel, úgy az a GvHD-s egérmodellekkel kapcsolatban is elmondható, hogy egyes sajátságaik könnyítik, mások erősen nehezítik a vizsgálatukkal kapott eredményeknek a humán klinikumba történő lefordítását.

A két gazda közt talán leginkább szembeűnő különbség a kórfolyamat dinamikája. A humán akut- és krónikus GvHD egyik diagnosztikus elkülönítési lehetősége a legutóbbi időkig az időbeni lefolyás volt, lévén ez humán rendszerben, minden gyengesége ellenére, egy hasznos diagnosztikai fogódzónak számított. Érdekes, hogy egérmodellekben ez az időalapú megkülönböztetési megközelítés nem feltétlenül működik, illetve a két forma megjelenése sokkal gyorsabb, manifesztációs időablaka is sokkal szűkebb. Például a krónikus GvHD egérben már a transzplantációt követő második héten jelentkezhet, ami humán rendszerben gyakorlatilag nem fordul elő.

Egerekben így a két GvHD-s manifesztációs forma megkülönböztetése már a kezdet kezdetétől a tünetek, és az immunológiai háttérmechanizmus alapján történt. Ezen a ponton az egér modellrendszerek nagy előnye, hogy a humán és az egér rendszer között az immunológiai háttérmechanizmusban számos hasonlóság van. Az akut GvHD-s egérben is inkább egy Th1-jellegű, javarészt citotoxikus hatáson alapuló, diszkrét szervi

érintettséggel jellemezhető tünetegyüttest tapasztalunk, melynek érintett szervei (vékonybél, máj, bőr) javarészt átfednek a humán betegekével. Ezzel együtt egérben a tüdő aGvHD-s érintettsége is gyakori, ami emberben igen ritka. További előny, hogy egérben a krónikus GvHD is egy a humán megbetegedéshez hasonlóan Th2-alapú, fibrózissal járó, humorális válasz indukálta kórképként írható le. Végül nagy előny, hogy a törzsek beltenyésztettsége révén a GvHD különböző formái jellemzően a kísérletekbe vont állatok nagy arányában, igen reprodukálhatóan, és adott major/minor mismatch-ek mellett azonos formában jelentkeznek, és jelzik is azok jelentőségét az egyes kórképekben. Így számos leírt donor → recipiens egértörzs-kombinációban csak a GvHD egyik vagy másik formája alakítható ki (pl: DBA/2→B6D2F1, kizárólag krónikus GvHD modell).

Ezzel együtt az időbeli lefolyáson túl számos egyéb különbség is van a rágszáló modellben kiváltott GvHD, és a humán betegség között. Elsőként, az egérmodellben fellépő aGvHD sokszor hatással van a cGvHD kialakulására, míg emberben a cGvHD leggyakrabban aGvHD nélkül jelentkezik. Másodszor, az emberi páciensek esetén a legtöbb beteg profilaxisban részesül az aGvHD megelőzésére, míg az egérmodellekből, amikben pont a GvHD gyors, reprodukálható, nagy arányban való kiváltása a cél, ezt értelemszerűen elhagyják. Harmadszor, az egérmodellekben ugyanezen okokból a graftot sokszor szándékosan egészítik ki nagyszámú T-sejttel, jellemzően lép-eredetű sejtekkel, ami humán páciens esetében természetesen nem történik meg. Végül a legtöbb egérmodellben a recipiens sugárterápiás immunszuppresszióban részesül, míg a kemoterápia alkalmazása lehetséges, de körülményesebb kivitelezni, és ezért nem preferált (117). Emberek esetében ez pont fordított; emberben még a sugárterápia is kiegészítésre kerül kemoterápiás szerek alkalmazásával. A modellekben alkalmazott sugárterápia általában TBI, amely gyorsabb donor kimérizmust eredményez, és szinte sosem jár a graft kilökődésével. E ponton érdemes megjegyezni, hogy a különböző egértörzsek különböző mértékben érzékenyek a TBI-re, például a BALB/c érzékenyebb, mint a C57BL/6.

További probléma, hogy az egértörzsek mindig beltenyésztett állatokat takarnak, így náluk mindig egy homogénebb válasz alakul ki, mint idegen donoros humán betegeknél. A kísérleti állatok tartása emellett gyakran tisztatérben, SPF státusz fenntartása mellett, vagy steril körülmények között történik, így immunrendszerük sosem lesz kitéve olyan

környezeti hatásoknak és patogéneknek, mint egy humán páciens, illetve mikrobiom-diverzitásuk is sokkal kisebb szabadon élő társaikénál, illetve a kezelt emberi páciensekénál. Emberekben leírásra került az is, hogy bizonyos vitaminok befolyásolhatják a T-sejtek felszínén megjelenő homing molekulák expresszióját, így befolyásolva különböző szervekbe történő vándorlásukat. A bőr esetében ilyen vitamin a D3, amelynek aktív formája a bőrben napsugárzás hatására is kialakulhat és emeli a CCR10 expresszióját a T-sejteken. Egy másik ilyen vitamin az A vitamin, amely a bél Peyer plakkjaiban található DC-k által retinsavvá alakul és fokozza az $\alpha\beta 7$ integrin és CCR9 kemokin receptor expresszióját, így fokozva a T-sejtek bélbe vándorlását. Ezzel szemben a kísérleti állatokat nem éri napfény, illetve testüket sűrű szőrzet borítja, így ilyen típusú folyamatok nem mennek végbe bennük.

Azonban nem szabad elfelejtenünk, hogy a fentiek ellenére az egérmodellek használata alapvetően járult hozzá mai aGvHD ismereteinkhez, a jelenleg is használt profilaktikus- és terápiás kezelések létrejöttéhez, illetve a mai napig számos jelenleg zajló fejlesztésben is megkerülhetetlen szerepet játszanak (53). A következőkben a jelenleg elérhető aGvHD modellek kerülnek bemutatásra, azok előnyeit és limitációt is bemutatva.

2.4.2 MHC mismatch-alapú aGvHD egérmodellek

Az MHC mismatch modellek esetében a donor és a recipiens állat általában két különböző beltenyésztett egértörzsből származik, melyekben a humán MHC egér megfelelője, a H2 génkomplex eltérő. Közülük is talán a leggyakrabban alkalmazott rendszer a C57BL/6 \rightarrow BALB/c modell. Ez a rendszer az MHC különbségen túl (C57BL/6 H2^b \rightarrow BALB/c H2^d) számos miHA eltérést is mutat, ám a miHA eltérések jelentősége a betegség patofiziológiájában és a klinikai tünetek megjelenésében szinte elhanyagolható.

Az ilyen modellek alkalmazása esetén mindig mieloablatív sugárkezelést alkalmaznak, egy vagy több dózisban, törzstől függően 10-11 Gy-el, a dózisok között 3-8 óras szünetekkel a bélkárosodás csökkentése végett. A kialakuló aGvHD-ban jellemzően a CD4⁺ és CD8⁺ T-sejtek is szerepet játszanak, de a modellek e tekintetben meglehetősen flexibilisek.

Amennyiben ugyanis a vizsgált kérdés szempontjából fontos a két T-sejt alcsoport valamelyikének elkülönített vizsgálata, azaz a másik kizárása, úgy az is megoldható. Például a modell megváltoztatható szingenikus, de kompatibilis MHC I vagy MHC II

allélokat hordozó donorok mellett inkompatibilis MHC II vagy MHC I allélokat hordozó recipiens egerek felhasználásával. Értelemszerűen míg az előbbi esetben csak CD4+, az utóbbiban csak CD8+ T-sejt aktiváció alakul ki, és a szingenikus háttér miatt az egyéb illetve minor antigéneknek nincs hatása. Például kizárólag CD8+ T-sejtes aGvHD váltható ki H2^b C57BL/6 donorok, és H2^{bm1}C57BL/6 recipiensek felhasználásával, utóbbiban többszöri visszakeresztelés segítségével átvitt inkompatibilis MHC-I (H2^{bm1}) változattal. Hasonló módon, mivel az MHC II-n keresztül a CD4+ T-sejtek aktiválhatók, H2^{bm12} recipiensek használhatóak kizárólag CD4+ T-sejtek aktivációjának kiváltására. Például ilyen modellek segítségével tárták fel, hogy az aGvHD-ban a CD4+ T-sejteket recipiens és donor eredetű APC-k, míg a CD8+ T-sejteket csak a recipiensből származók képesek aktiválni (118, 119).

A másik gyakran használt ilyen típusú megközelítés a „parent to F1” (P→F1) modell, melyben adott inbred (beltenyésztett) törzs a donor (pl. C57BL/6, P), és ezen törzsnek egy másik inbred törzsszel nemzett első generációs utódja (pl. C57BL/6 x DBA2 = B6D2F1) a recipiens. Ez utóbbi modellcsoportban a donor és a recipiens közötti részleges MHC és miHA egyezés, voltaképpen egy haploidentikus transzplantáció kialakítása révén működik, és nagyon jól használható a RIC típusú illetve a MAC nélküli transzplantációs körülmények leírására. Segítségével betekintést nyerhettünk a T-sejtek *in vivo* aktivációjába és a betegség során lejátszódó autoimmun folyamatokba, de manapság előszeretettel használják a sejt- vagy antitest-mediált immunválaszokban szerepet játszó immunmoduláló hatású anyagok azonosítására is. Ugyanakkor ez a modell sem teljesen tükrözi a valós hematopoetikus őssejttranszplantációt, lévén ezekben a rendszerekben az F1 állat nem esik át sugárkezelésen a beültetés előtt. Ez azzal a következménnyel jár, hogy a besugárzott modellekhez képest kisebb súlyvesztést, enyhébb bőr tüneteket tapasztalunk, illetve voltaképpen egy immunhiányos állapotot látunk kialakulni, kevert kimérizmussal és jobb túlélési mutatókkal. Érthető okokból ez a modellcsoport nagyobb jelentőséggel bír a nem mieloablatív kezelések megjelenése és elterjedése óta. Mint korábban már említettük, fontos megjegyezni, hogy nem minden szülői törzs (P) képes bármely más törzsszel való keresztezés után az (F1) utódaival aGvHD kialakítására. Ennek oka nem mindig világos, talán az egyes törzsekre természetesen jellemző Th1 vagy Th2 válaszreakciós dominancián is alapulhat (120).

2.4.3 miHA mismatch modellek

Mivel a klinikumban lefolytatott aHSCT esetén a klinikus törekszik a donor és recipiens között fellépő különbségeket minimalizálni, ezért az MHC mismatch modellek kevésbé reprezentatívak a humán aHSCT-k jelentős részének esetére. Ennek a hiányosságnak az áthidalására hivatottak a miHA mismatch modellek, melyek már jobban reprezentálják a tényleges humán aHSCT-t, hiszen itt már MHC szinten egyező donor és recipiens állatokat használunk. E modellek az MHC mismatch modellekhez képest kisebb halálozási aránnyal járó, ám ugyanúgy letális GvHD kiváltására képesek. Ilyen CD8+ T-sejt válaszon alapuló aGvHD modell például a DBA/2 (H2^d) → B10.D2 (H2^d) rendszer, melyben a donor és a recipiens két, többszöri backcross hatására ugyan MHC-azonos, de eltérő inbred törzsből származik. Ez a kísérletes felállítás számtalan, azonban jórészt tökéletesen ismeretlen miHA mismatch-ének a komplex hatásán alapuló aGvHD kialakulásához vezet (121).

2.4.4 Xenogén modellek

Mint ahogy a nevük is mutatja, esetükben az allogén HSCT-vel szemben olyan transzplantációról van szó, amikben a donor és a recipiens között nem csak vannak genetikai eltérések, de azok igen penetránsak is, mivel különböző fajokból is származnak. Az ilyen modellek jellemzője az allogén HSCT-nél sokkal robosztusabb immunválasz, ezért például a graft kilökődésének elkerülésére erősebb immunszuppressziót kell alkalmazni, mint az előző két modell esetében. Az ilyen modellek leggyakrabban használt formája humán sejtek egérbe történő transzplantációján alapszik.

Az első ilyen transzplantáció nem obéz diabetikus, és Prkdc^{scid} allélt hordozó, emiatt egyben súlyos kombinált immundeficiens, ún. NOD-SCID egerekbe bevitt humán sejtekkel történt. Ebben a modellben a recipiens T- és B-sejt válasza jórészt defektív, ám az NK-sejt aktivitás a törzstől függően csak változó mértékben érintett, ezért továbbra is alacsony graft megtapadással számolhatunk, ami csak 1-20% körüli (122). Ezen SCID modell továbbfejlesztett változataiban (RAG és IL-2 receptor γ vagy $\beta 2$ mikroglobulin null) teljesen megszüntethető a T-, B- és NK-sejtes válasz is, így remekül monitorozható a donor humán sejtek *in vivo* vándorlása is (123, 124). Ez a modell számos fontos megfigyelés megtételét tette lehetővé, például bizonyította, hogy a retroorbitálisan beadott T-sejtek eljutottak a különböző perifériás szervekbe, ahol a súlyos aGvHD-ra jellemző tüneteket produkálták, míg az intravénás bejuttatás esetén a sejtek először a

tüdőbe vándoroltak és kevésbé súlyos aGvHD-t okoztak, kisebb mortalitási és morbiditási mutatókkal (124).

NOD-SCID háttérre visszakeresztett homozigóta IL-2 receptor γ lánc defektus, (NSG modell) alkalmazása esetén pedig nem csak a T-, B- és NK-sejt válasz kiesésével lehet számolni, hanem a DC-k és makrofágok csökkent válaszképességével is. Ebben a rendszerben van példa mobilizált humán PBMC transzplantációjára is; az immundeficiens állatba bejutatott PBMC egy CD4⁺ T-sejt függő GvHD-t hoz létre. A rendszer sajátsága, hogy mivel a T-sejtek TCR-je csak fajazonos MHC-t képes felismerni, így az egér APC-k kizárodnak a kórfolyamatból, és a humán (donor) APC-k MHC II-n keresztül prezentálják az egér antigéneket (125).

A xenogén modellek nagy előnye, hogy humán sejtek GvHDs működése *in vivo*, jórészt korlátozás nélkül vizsgálható bennük szinte bármilyen szövetben. Hátrányai közé tartozik a NOD-SCID és NSG állatok fenntartásának költségessége és körülményessége, illetve az, hogy a donor és a recipiens fajszintű különbségei miatt egészen életidegen folyamatok is lezajlanak bennük.

2.4.5 Antigén-specifikus transzgén TCR modellek

Az aGvHD eddig részletezett MHC- és miHA-mismatchen alapú transzplantációs modelljeinek egyik jelentős hátránya az, hogy számos antigénre adott, komplex, kevert T-sejtes válaszokon alapulnak, és nehéz bennük meghatározni azt a specifikus alloantigént, amelyre egy adott reagáló T-sejt voltaképpen aktiválódott. A probléma orvoslására olyan, meghatározott specifitású TCR-t expresszáló T-sejteket tartalmazó TCR-transzgén egerek alkalmazhatóak, amelyek minden T-sejtjükön kifejeződő és csak egyetlen, ismert epitóp felismerését lehetővé tevő TCR-t hordoznak. A felismerés általában egy olyan peptid epitópra korlátozódik, amelyet vagy a transzplantált allogén APC-k konstitutívan expresszálnak, vagy exogén antigénként adják be, hogy stimulálják a T-sejt-választ. Ilyen modellek például a H-Y, TS1, OT-I és OT-II donorokon alapuló modellek. Ezek a modellek tették lehetővé az aGvHD-s T-sejtes aktivitás számos aspektusának vizsgálatát, mint például az antigén iránti TCR affinitás jelentőségét (126), az antigénnel indukált T-sejt aktiválódást és proliferációt, a Treg sejtek funkciójának megértését (127), vagy az antigének keresztprezentációjának vizsgálatát (128).

Ennek a csoportnak egy ismert példája az OT-I/K14-OVA rendszer. A modellben a donor törzs a CD8⁺ T-sejtes immunológiai kutatásokban legtöbbet vizsgált egér modellszervezeteinek egyike, az OT-I állat (129). A modell alapja az, hogy az OT-I donor állat CD8⁺ T-sejtjein megtalálható TCR nem szabad rekombináció eredményeként jön létre, hanem egy előre átrendezett, emiatt azonnal elérhető és kifejezhető, tehát „kész” transzgén TCR. Mivel ez a TCR a genomban eleve átrendezett, kész formában van jelen, ezért az érő CD8⁺ T-sejtek további TCR génátrendeződése jórészt elmarad, és a CD8⁺ T-sejteken egy teljesen invariábilis transzgén TCR jelenik meg, azaz szinte minden CD8⁺ T-sejt ugyanazt a transzgén TCR-t fogja hordozni. Az OT-I egerek esetében ez TCR egy a Tcr α -V2 / Tcr β -V5 T-sejt-receptor, mely kizárólag a csirke ovalbumin 257-264 oktapeptid epitópját (SIINFEKL peptid) képes felismerni, és azt is csak a H2^{kb} MHC I által prezentált formában. A recipiens K14-OVA állat minden APC-jén és parenchymális sejtjén megtalálható a H2^{kb} MHC I, és az állat egyben a bőrben aktív citokeratin 14 (K14) promóter szabályozása alatt expresszálja a csirke ovalbumint, többek között a H2^{kb} MHC I által prezentálható SIINFEKL epitópot is. Az OT-I/K14-OVA transzplantáció során a graftban található összes OT-I CD8⁺ T-sejt specifikus TCR-el rendelkezik, amelyek mindegyike reagálhat a recipiens K14-OVA állat bőrében prezentált SIINFEKL epitóppal, így kialakítva a kután aGvHD jellemző tüneteit. Értelemszerűen a modellben a bőrre jellemző tünetek nagymértékben reprodukálhatóak, ám az aGvHD egyéb szerv specifikus formái, mint például a GI vagy a máj érintettsége nem alakul ki, így nem reprezentálja a klinikumban végbemenő folyamatokat. Érdekeség, hogy a modell nem igényel semmilyen kondicionáló kezelést, szemben a klinikummal, ahol a betegség egyik fő hajtóereje tehát a kondicionálás okozta szövetkárosodás (130).

2.5 A CD8+ citotoxikus T-sejtek az aGvHD kórfolyamatának kitüntetett effektor sejtjei

Mint arra a korábbiakban már többször utaltunk, az aGvHD patomechanizmusának kiváltásában kulcsszerepet játszanak a CD8+, vagy citotoxikus T limfociták (CTL). Az emberi szervezet homeosztázisának fenntartásában és a különböző fertőzések elleni védekezésben jelentős szerepe van a szervezetben keringő számos T-sejt populációnak, melyek az adaptív immunrendszer sejtjeihez tartoznak. E sejtek egyedi sajátága, hogy nagy specificitással ismerik föl az MHC-n bemutatott epitópokat az egyedi, antigénspecifikus T-sejt receptorukon (TCR) keresztül. A TCR-ek összetétele alapján megkülönböztethetünk konvencionális adaptív immunrendszert $\alpha\beta$, illetve a természetes immunrendszer körébe tartozó, ritkább $\gamma\delta$ vagy $\alpha\alpha$ T-sejteket. Az $\alpha\beta$ TCR-rel rendelkező sejtek esetében funkcionális szempontból elkülönülnek az CD4 molekulát hordozó helper (segítő, Th) T-sejtek, és a CD8 koreceptort expresszáló citotoxikus T-sejtek (CTL). A CD4+ helper T-sejtek citokin termelésük révén képesek más immunsejtek aktivitását szabályozni. Elengedhetetlenek többek között a B-sejt aktivációban és antitest-osztályváltásban, a citotoxikus T-sejtek aktiválásában és növekedésében, valamint a fagociták, például a makrofágok baktericid aktivitásának maximalizálásában. Ezzel szemben a CD8+ citotoxikus T-sejtek elsősorban az intracelluláris patogénekkal szemben lépnek fel. A CTL-ek feladata főként vírusfertőzött vagy daganatsejtek, egyes intracelluláris bakteriális fertőzések és bizonyos intracelluláris eukarióta paraziták eliminálása (131). A CD8+ T-sejtek érési folyamata komplex, első körben érettségi fokuk szerint tovább kategorizálhatóak: éretlen, érett naív, effektor és memória T-sejtekre.

Az érett naív $\alpha\beta$ CD8+ T-sejtek (a továbbiakban: CD8+ T-sejtek) olyan a tímuszból frissen kijutott, érett, azaz a pozitív és negatív szelekción már átesett TCR-rel rendelkező T-sejtek, melyek azonban még nem találkoztak egy őket aktiváló antigénnel. Ezek a sejtek nagyon kis mennyiségben vagy egyáltalán nem termelnek citokineket, és alkalmatlanok a patogénekkal szembeni védekezésre, illetve a perifériás szövetekbe való belépésre. Az ilyen CD8+ T-sejtek egész testre kiterjedő folyamatos recirkulációt folytatnak a vérerekből a másodlagos nyirokszervekbe, majd a nyirokkeringésen keresztül vissza a vérkeringésbe, melynek egyetlen célja az őket aktiválni képes antigénnel való találkozás. Járőrözésük során folyamatosan keresik a külső környezetből

származó, vagyis nem saját és sok esetben veszélyes antigéneket, amelyek egy fertőzés vagy szövetskárosodást követően kerülnek a szervezetbe.

A naiv T-sejtek az APC-vel a nyirokcsomókban találkozá, a megfelelő antigént felismerve és a kostimulációs hatások révén nagyon gyorsan, számos osztódást hajtanak végre. Ennek során egyetlen T-sejt akár 10 000 utódsejtet is létrehozhat. Ezek az újonnan keletkező sejtek az effektor sejtek, melyek igaz rövid életidejűek, ám számos effektor funkcióval rendelkeznek (citokin termelés, citolízis) és naiv társaiktól eltérően elhagyják a keringést és a perifériás szövetekbe vándorolnak, ahol effektor funkciójuk révén részt vesznek a kórokozók elhárításában. Aktivációjukat követően a CD8⁺ T-sejtek gyors ütemben, többféle effektor funkciót kiváltva lépnek fel az általuk elhárítandó patogének ellen.

Ezek egyike a fertőzött testi sejtek citotoxikus elpusztítása, mely különböző intracelluláris patogének ellen, különböző citotoxikus effektor molekulák használatával hatékony. Mind nyilvánvalóbb, hogy a TRAIL (TNF-rokon apoptózist kiváltó ligand), a FasL, a granzim B, A, H, K, M igen eltérő, ráadásul sokszor nem csak, vagy főként nem is citotoxikus hatásaival szemben egyes intracelluláris kórokozók eltérő érzékenységet mutatnak (pl. a RSV (respiratorikus szinciciális vírus) TRAIL érzékeny, a LCMV (limfocitás choriomeningitis vírus) granzim B-re fogékony, stb.); ezt a variábililitást a CTL aktívan leköveti, megfelelő molekulát használva egy adott kórokozóval szemben. A citotoxikus effektor funkciókon túl a CD8⁺ T-sejtek a közvetlen öléstől független effektor hatásokat is kifejtenek. Egyes esetekben indukálják a kórokozó genomjának lebontását (pl. Hepatitis B vírus, HBV), látens fertőzést kényszerítenek ki (pl. HSV), a fertőzött T-sejtet átprogramozzák, és felhatalmazzák egyes bennük szaporodó paraziták elpusztítására (pl. *T. gondii*, *T. cruzii*), más leukocitákat toboroznak a kórokozó elhárítására (pl. *L. monocytogenes*), felerősítik az endogén antigének lokális prezentációját, illetve szabályozzák a helyi immunválaszokat. Mindezek révén a CD8⁺ T-sejtek elemi jelentőséggel bírnak számos intracelluláris kórokozó gyors eliminálásának (számos vírus) végrehajtásában, avagy perzisztáló kórokozókkal szembeni hosszú távú kontrolljának fenntartásában (pl. *M. tuberculosis*).

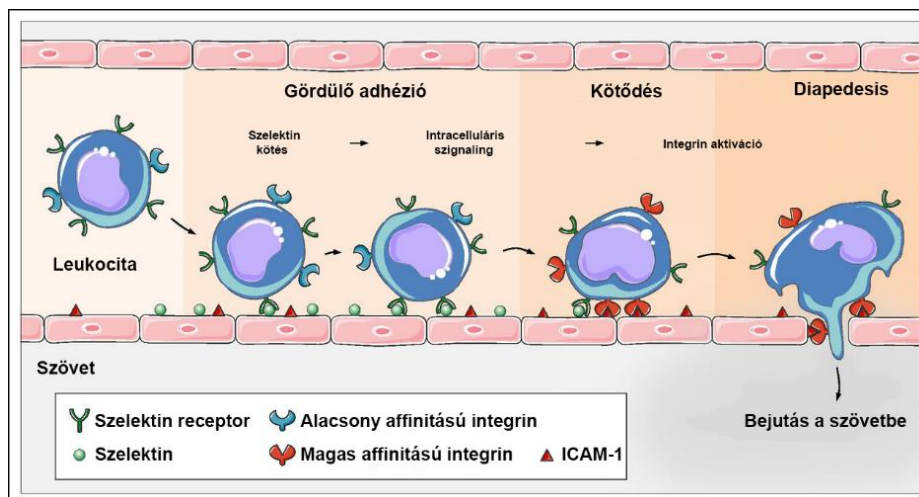
A fertőzés leküzdését követően az aktivált CD8⁺ T-effektor sejtek közelítőleg 90-95%-a apoptózissal elpusztul, míg kis hányaduk hosszú életidejű memória sejtekké lesz, így

biztosítva az újrafertőződés során a még hatékonyabb immunválaszt. A memória sejtek az előző két csoport, tehát a naiv és effektor sejtek területein, vagyis a szekunder nyirokszervekben (önfenntartó szaporodás illetve a perzisztáló antigén okozta újraaktiválódás miatt), illetve a perifériás szövetekben (azonnali immunitás biztosítása) is megtalálhatóak. A T-sejtek ezen dinamikus változását kíséri a sejtek génexpressziós profiljának változása, amely befolyásolja mozgásukat és szervezeten belüli lokalizációjukat, illetve a lokalizációnak megfelelő változatos funkciókat biztosít a különböző T-sejt populációknak.

2.5.1 CD8+ T-sejtek homingja az a GVHD patológiájában

Mint arra korábban már utaltunk, az aGVHD kialakulása során kitüntetett jelentősége van a citotoxikus szövetkárosodásért elsődlegesen felelős CD8+ T-sejtek adott célszervekbe történő, elsődlegesen a bőrbe illetve a bélbe zajló, irányított homingjának. Általában ahhoz, hogy a CD8+ T-sejtek kifejtsék a szervezetet intracelluláris kórokozókkal szemben védő, vagy az aGVHD során éppen ellenkezőleg, aktívan szövetkárosító hatásukat, elengedhetetlenül szükséges a vérkeringés elhagyása és a perifériás szövetekbe történő belépés, vagyis a transz-endothéliális migráció.

Ez a migrációs folyamat négy fő lépésre bontható. A folyamat első lépése a lassulás, hiszen a vérkeringéssel utazó immunsejtek túl gyorsan haladnak ahhoz, hogy a vérerek falával kapcsolatba léphessenek, így a 4000um/sec sebességükről 40um/sec sebességre kell lelassulniuk. A lassulást a sejteken termelődő mucinok, illetve az érfalon termelődő szelektinek kapcsolata teszi lehetővé. Ezt követi a gördülés fázisa, amelynek során a sejt és az érfal egyre közelebb kerül egymáshoz, és a sejt polarizálódik. Ennek során továbbra is a szelektinek játsszák a főszerepet. Ezt követően egy aktivációs lépés keretében a sejt és az érfal között egyre erősebb kötődés alakul ki, melyben az aktivációs szignálok hatására megjelenő egyre több kemokin és integrin a felelős. A folyamat vége a diapedezis, amikor a sejt két endothél sejt között haladva a véráramból a szövetbe kerül (132). A folyamat a **9. Ábrán** látható részletesen.



9. Ábra: A transz-endotheliális migráció folyamata, Forrás:(133)

A T-sejtek vándorlását a különböző szövetekbe elsősorban a szelektinek, integrinek, kemokinek és azok ligandjai szabályozzák. A legfőbb szelektinek az L, P-és E szelektinek, melyek közül az L a naiv T-sejtek felszínén, míg a P és E változat pedig a gyulladt endothélián expresszálódik. A T-sejtek felszínére jellemző P szelektin ligand (PSGL-1), elsősorban a P szelektinnel kapcsolódik, de a másik két szelektinnel is interakcióba léphet. Ezek a kapcsolatok fontos szerepet játszanak a T-sejtek különböző aktivációs szintjein a különböző perifériás szövetbe való vándorlásban, a transz-endotheliális migráció lassulás és gördülés fázisának megvalósításával. Az integrinek heterodimer sejtfelszíni receptorok, melyek kapcsolódásának erőssége ligandjaikhoz sejtes stimuláció hatására növelhető. Ez a folyamat az úgynevezett inside-out signaling, vagyis a sejt citoplazmájából induló szignalizációs útvonal képes a sejt belseje felől növelni a felszíni integrin kötési erősségét. Az integrinek is fontos szereplői a transz-endotheliális migráció aktivációs illetve diapedezis lépésének, mely során a sejt nagyon közel kerül az endothéliához. Legjelentősebb általános kapcsolódási pontok; az LFA-1 és az endothélium/HEV által termelt ICAM-1 kapcsolat vagy a VLA-4 és VCAM-1 aktivált T-sejteken, diapedezisben betöltött szerepe.

Az adhéziós molekulák mellett szintén kiemelt jelentőségű molekulacsoport a kemokinek családja, melynek fő funkciói a kemotaxis indukálása, a sejtek adhéziójának fokozása és effektor leukociták aktiválása. Emberben eddig több mint 50 kemokint és 18 kemokinreceptort azonosítottak. A homeosztatikus kemokinek esetén a gyulladásos

ingerek hiányában történik a szabályozás, míg a gyulladásos kemokinek esetén az effektor T-sejtek a gyulladás helyszínére történő toborzása, illetve további gyulladásos kemokinek termelődésének fokozódása figyelhető meg. Ezek együttesen egy olyan irányítószámot határoznak meg, mely megadja, melyik T-sejt marad a keringésben, melyik léphet be és melyik perifériás szövetbe, illetve melyik vándorolhat a másodlagos nyirokszervekbe. A vándorlás szabályozása 3 kiemelt területen történik: a) az érhalózat mikrovaszkuláris területein, ahol a sejtek transz-endotheliális migrációval elhagyják a véráramot, b) a kemokinek termelő sejteknél, ahol a T-sejtek kapcsolatba léphetnek a célsejtekkel, c) illetve a nyirokrendszerrel, ahol a sejtek képesek elhagyni az egészséges, avagy gyulladt szövetet (132). Eddig az aktivált T-sejtek négy fő homing célszerve került leírásra, melyek a bőr, a bélrendszer, a tüdő és az agy (134-136). Ezen célszervek közül is kettő, a bőr és a bélrendszerre jellemző homing folyamatok az eddig legjobban részletezettek, ám sajnos a mai napig nagyon keveset tudunk a T-sejtek, illetve azok alcsoportjainak homingjáról és szabályozásáról. Illetve kevés olyan markerrel rendelkezünk, amely csak egy szövetbe történő vándorláshoz szükséges, és csak egy fajta sejttípuson jelenne meg, így specifikálva a különböző migrációs folyamatokat. Látni kell emellett, hogy egyes szervek között jelentős különbség lehet a homing folyamat kontrolláltságában. Vannak permisszív, a T-sejtek bevándorlását szinte minden körülmények között megengedő szervek (pl. máj), szabályozottabb szervek, amelyekbe való belépés folyamatos, de határozott kritériumokhoz kötött (pl. bél, bőr), illetve zárt szervek, amelyekbe való bejutás erősen szabályozott, és normál körülmények között csak nagyon kis mértékben engedélyezett (pl. agy).

2.5.1.1 A bőr irányú homing

A T-sejtek bőrbe lépéséhez nem csak a T-sejtek felszíni markerei, de a bőrszövet endothelsejtjein megjelenő számos adhézión (P-és E szelektin, ICAM-1, VCAM-1) és gyulladásos kemokin expressziója is elengedhetetlen. A veleszületett immunitással ellentétben a T-sejtek felszínén nem folyamatos a P-és E szelektin ligandok expressziója, így az adhézión molekulákhoz való kötődésük mindig az adott antigén okozta aktiváció következménye; ezért is képtelenek a naiv T-sejtek ezen szelektinekhez kapcsolódni és a perifériás szövetekbe lépni. Számos kemokin leírásra került a bőrbe történő vándorlás kapcsán, azonban ezek közül csak kevés mutat szelektív, kizárólag a bőrre jellemző expressziót.

Az egészséges bőr kétszer annyi T-sejtet tartalmaz, mint a vér. Ezen sejtek 98%-a hordozza a CLA sejtfelszíni antigént (Cutaneous lymphocyte-associated antigen, Kután Limfocita-Asszociált Antigen), mely egy a szialil-LewisX (sLeX)-et hordozó glikán motívum. A CLA-t a glikoziltranszferáz α 1,3-fukoziltranszferáz-VII (FucT-VII) szintetizálja, és a P és E szelektin ligandok jó részére felkerülhet. A CLA fontos sajátossága, hogy mint az érfalhoz való kötődést facilitáló molekula, már a bőr homingra programozott, keringő T-sejteken is jelen van. Emiatt a CLA a bőrbe vándorló T-sejtek talán legfontosabb markere, mely a P és E szelektinnel való kapcsolódása révén részt vesz a T-sejtek lassulásában és gördülésében az endothélián való átlépés során. Ezek a kapcsolatok azonban nem kizárólagosan a bőrre korlátozottak, ami feltételezi további bőr homing molekulák szerepét is a folyamatban (137).

Ilyen fontos további kapcsolódási pont a VLA-4-VCAM-1 kapcsolat, mely az általános LFA-1-ICAM-1 interakció mellett a diapedezis lépését segíti elő a bőrbe. További, a bőr homingban szerepet játszó marker a CCR4 gyulladásos kemokin receptor, és ligandja, a dermális fibroblasztok által termelt CCL17 közötti kapcsolat. A CCR4 alacsony expresszióját rheumatoid arthritises betegek tüdejében és szinoviális folyadékában található limfocitákon is leírták, tehát ez sem kizárólagos bőr homing specifikus marker (138). Végül szintén a bőr irányú T-sejt hominghoz köthető a CCR10 kemokinreceptor is, amely az epithelsejtek által termelt CCL27, más néven Cutaneous T-cell-attracting chemokine (CTACK) felismerése révén irányítja ezeket a T-sejteket az epithelsejtek közelébe, elsődlegesen és különösen a bőrbe (139, 140). A CCL17 és a CCL27 közti alapvető különbség, hogy az utóbbi nem csak gyulladásos folyamatokban termelődik, hanem az intakt egészséges bőrszövet is folyamatosan szintetizálja.

2.5.1.2 Bél irányú homing

A bél irányú homing kapcsán is igaz, hogy nem csak a T-sejtek felszínén megjelenő markerekre, hanem a bél endothél sejtjein expresszáldó adhézios molekulákra is szükség van a szövetbe való belépéshez. A bél irányú vándorlás során a T-sejtek α 4 β 7 integrint és CCR9 kemokin receptort expresszálnak felszínükön, és a bélre jellemző MAdCAM1 és CCL25 kemokinnel reagálva lépnek be a szövetbe (134, 141).

Az α 4 β 7 integrin ligandja a MAdCAM1, mely mind steady-state körülmények között, mind gyulladásban az intesztinális traktus endothél sejtjein fejeződik ki. Az α 4 β 7 integrin gyulladásban betöltött szerepét mutatja, hogy a humanizált α 4 β 7 integrin specifikus

antitest (vedolizumab) klinikai és endoszkópos remissziót indukál ulceratív colitisben szenvedőknél (142). Meg kell jegyezni, hogy az $\alpha 4\beta 7$ egy kiemelt és specifikus markere a bél irányú vándorlásnak, ám nem abszolút feltétele a T-sejtek intesztinális mucosába lépésének. Például rotavírus infekció során a $\beta 7$ integrin deficiens CD8⁺ effektor T-sejtek képesek voltak a bél nyálkahártyába lépni, és immunválaszt létrehozni (143). A kemokinek is elmaradhatatlan szereplői a bél irányú vándorlásnak.

A CCR9 egy másik kiemelt fontosságú bél homing marker, mely több típusú T-sejten is megtalálható. Ligandja, a CCL25 folyamatosan és szelektíven a vékonybél epithéliumán expresszálódik (144). Azonban a CCR9/CCL25 interakció sem kizárólagos a bél irányú vándorlásban, hiszen CCR9 knockout egerek esetében is megfigyelhető volt a T-sejtek vékonybél irányú vándorlása (145). Végül érdemes megemlíteni, hogy a fentiek elsősorban a vékonybél-irányú homingra vonatkoznak, egyéb bélszakaszok homing szabályozása ettől többé-kevésbé eltér így már a vastagbélbe való homing sem teljesen azonos az itt leírtakkal.

2.5.1.3 T sejt homing a kután és gasztrointesztinális aGvHD során

Az aGvHD kialakulása során a grafftal bevitt, donor eredetű érett naiv és memória CD8⁺ T-sejtek a recipiens APC-in található MHC I-n keresztül aktiválódnak, ami a vérben keringő nem naiv CD45RO⁺/CD8⁺ sejtek számának növekedésében, illetve ezen sejtek felszínén megjelenő szövetspecifikus homing markerek emelkedett expressziójában nyilvánul meg (146, 147). A folyamat során az aktivált CD8⁺ T-sejtek homingja imprintálódik, aminek hatására azok az aGvHD-ban érintett perifériás célszövetekbe vándorolnak, ahol lokális citokin termelésük és citotoxikus aktivitásuk révén szövetkárosodást okoznak (148).

Azonban az aGvHD kialakulása során nem csak az APC-k által irányított, kontrollált, szövetspecifikus T-sejt homing figyelhető meg. Megfigyelések szerint, a kontrollált vándorlással egyidőben a T-sejtek egy része a citokinvihar által is aktiválódhat, ami egy nem irányított vándorláshoz is vezet (149). A citokinvihar hatására az érintett szervek egyszerű parenchimális sejtjei is APC funkciókat nyernek (150), így közvetlenül az érintett szövetben képesek, legalábbis naiv CD4⁺ T-sejteket bizonyosan, MHC II-n keresztül aktiválni. Ezek a helyszínen aktivált naiv CD4⁺ T-sejtek értelemszerűen semmilyen homing előreprogramozáson nem esnek át, és homingot nem is végeznek;

egyelőre azonban még nem tisztázott, hogy ez a folyamat vagy ehhez hasonló lezajlik-e, és ha igen, milyen súllyal bír a CD8+ T-sejtek esetében.

E ponton érdemes megjegyezni, hogy a CD4+ és CD8+ T-sejtek nem csak funkcionálisan, de a szövetekbe történő bevándorlásuk szabályozásában is erősen eltérnek egymástól. Általában véve a CD8+ T-sejtek jobban függenek az egyes szövetekbe történő belépésükhöz a szövet specifikus markerek jelenlététől, mint CD4+ társaik (147, 151), így aGvHD esetében hatékonyabb prediktorai lehetnek az kórkép különböző szervi manifesztációinak.

Érdekes egybeesés, hogy a fő homing célszövetek közül a legjobban részletezett a bőr és a bélrendszer, melyek az aGvHD leggyakrabban érintett szervei is egyben (141). Az aGvHD homing marker kutatások kezdeti eredményei azt mutatták, hogy a T-sejteken megjelenő CLA és $\alpha 4\beta 7$ integrin ígéretes akut bőr és a gasztrointesztinális GvHD markerek lehetnek (146, 147, 152). Egerekben leírásra került, hogy a bél esetében az $\alpha 4\beta 7$ + T-sejtek depléciója enyhítette a gasztrointesztinális aGvHD tüneteit (153, 154), míg a bőr esetén a CCR10-CCL27 kapcsolat kiemelt fontosságú a CD4+ T-sejtek akut GvHD során történő bőr irányú homingjában (155). Ezen túlmenően számos kutatás vizsgálja ezen homing markerek biológiai terápiás célpontként való felhasználhatóságát, így az aGvHD terápiájának újabb lehetőségeit. Több monoklonális ellenanyag terápia már bevezetésre került a klinikumban vagy jelenleg is tesztelés alatt áll. Mind a natalizumab (anti-integrin $\alpha 4$), mind a vedolizumab (anti-integrin $\alpha 4\beta 7$) Crohn betegek és fekélyes vastagbélgyulladásban szenvedők kezelésére már engedélyezett, bevezetésre került monoklonális antitest-terápia. Az ellenanyag terápiák mellett használhatóak kismolekulás kemokinreceptor-antagonisták is, mint például a Traficet-ENTM, amely egy CCR9 specifikus antagonista. Hatásmechanizmusa révén képes blokkolni a T-sejt felszínén megjelenő CCR9-et, így gátolva ezen sejtek bél-irányú migrációját (156-158). A hatóanyag gyulladásos bélbetegségben, illetve Crohn betegségben került bevezetésre a gyulladás csökkentésére. Ezek a megbetegségek manifesztációjukban nagyon közel állnak az aGvHD-hez, így nem elképzelhetetlen, hogy ezen ismert vagy még ma ismeretlen homing molekulákat targetálva sikeres eredményeket érhetünk el az aGvHD prevenciójában vagy kezelésében.

A fentieket összefoglalva, a T-sejtek aktivációs állapota, illetve szervi lokalizációja is markánsan befolyásolja a sejtek sejtfelszíni homing markereinek jelenlétét. A T-sejtek vándorlása a szervezeten belül jól definiálható integrin, szelektin, kemokin molekulák, és ezek ligandjai/receptorai között létrejövő kapcsolatokon keresztül valósulnak meg, és dinamikusan követik az aktivációs szignálok, illetve a szervi lokalizáció és az ahhoz kapcsolódó effektor funkciókkal kapcsolatos igényeket.

Számos általános, illetve szűkebb, csak bizonyos T-sejtpopulációra, avagy aktiváltsági állapotra jellemző homing markert ismerünk, ám a homing markerek expressziós mechanizmusának, illetve szabályozásának mielőbbi, mélyebb megértése égető probléma. Ennek alaposabb feltárása jelentősen segítené különböző, egyes szervekre korlátozott, T-sejtek okozta megbetegedések új generációs, célzott terápiákkal történő kezelését.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Mint azt a bevezetőben áttekinthettük, az aGvHD az aHSCT-t követően fellépő, rendkívül komplex, magas mortalitási és morbiditási mutatókkal rendelkező megbetegedés. A betegség kiváltásában számos faktor játszik meghatározó szerepet, mint például az aHSCT során alkalmazott kondicionálás, az aGvHD profilaxis, a bevitt graft milyensége, a szövetkárosodás okozta citokin vihar, különböző immunrendszeri sejtek aktivációja, illetve e sejtek homingja, és az általuk okozott szövetkárosodás. Ezen faktorok mindegyike folyamatosan zajló, intenzív kutatások tárgya. Pontosabb megismerésük egyértelműen elősegítheti az aGvHD patomechanizmusának mélyebb megértését, a betegség prevenciójának, diagnosztikájának, vagy éppen terápiájának további fejlesztését.

PhD munkám célja a kután és gasztrointesztinális homing-ot folytató CD8+ T-sejtek összehasonlító vizsgálata, új és eddig ismeretlen markereinek azonosítása, és azok alapkutatási, diagnosztikus illetve prognosztikus értékének felmérése volt. Vizsgálataimat részben egy egér aGvHD modellrendszer alkalmazásával, részben humán aGvHD-s páciensek elemzésével végeztem.

Az aGvHD manapság is alkalmazott terápiájának és profilaxisának gold standard alapjai túlnyomó részben állatmodelleken végzett kutatások eredményei. Ám mint láthattuk, a rendelkezésre álló modellek 1) egyike sem felel meg teljesen a klinikumban végbemenő folyamatoknak, 2) az ilyen experimentális aGvHD-kben az érintett antigének spektruma tág, szöveti kifejeződésük, immunológiai hozzáférhetőségük, immunogenitásuk változatos, nem ismert 3) az őket felismerő CD8+ T-sejtek specificitása, azokra való reakciója, annak dinamikája nehezen kutatható. Mindez a modellekben kilakuló T-sejtes válasz poliklonális jellegéből, és a felismert antigének spektrumának komplexitásából adódik.

Ezért PhD munkám első konkrét célkitűzése egy új, minden eddiginél tisztább egér aGvHD modell kifejlesztése volt. A modellben a betegség kután és gasztrointesztinális manifesztációit egymással a lehető legjobban összevethető módon, azaz egyetlen, definiált miHA mismatch ellen kialakuló, egyetlen, definiált CD8+ T-sejt klón által kiváltott immunválasz folyamatában kívántuk vizsgálni.

Mint azt a bevezetőben szintén láthattuk, az irodalomban homing szempontjából legjobban leírt, de még ma sem teljesen ismert két szervi target, a bőr és a bélrendszer teljesen véletlenül az aGvHD által leginkább érintett két célszerv is egyben.

Nemigen ismert olyan más humán megbetegedés, amiben a bőrbe és a bélbe vándorló CD8⁺ T-sejtes homing csoportoknak az aktivációja egyazon megbetegedés keretében, egyazon stimulusra, párhuzamosan, és akár ugyanabban a személyben is vizsgálható lenne. Különösen nem úgy, hogy egy adott humán betegségben mindkét csoport aktivációja teljes mértékben bekövetkezik, és mindkettő mind citotoxikus aktivitással, mind valós klinikai relevanciával is bír.

A betegség viszonylagos ismertsége révén a vizsgálatokhoz, már rendelkezünk legalább egy bőr specifikus (CLA) és legalább egy bél specifikus (ITGB7) markerrel, amely alapján elkülöníthetők a részletesen összehasonlítandó CD8⁺ T-sejt szubpopulációk. Mint láthattuk, eddig nagyon kevés ehhez hasonló, szövet-specifikus T-sejt homing markerrel rendelkezünk. Emellett ezen markerek között is nagyon kevés az, amely csak egyféle sejttípuson jelenne meg, egy típusú aktiváltsági állapot esetén, és csak egyféle szövetbe való belépésre lenne specifikus. Ezért feltehető, hogy egy a homing markerek alapos elemzése, lehetőség szerint egy olyan betegségben, amiben a homing kulcsszerepet játszik, talán további homing markerek felfedezéséhez is vezethet.

Mint láthattuk, az aGvHD patomechanizmusában nem csak a CD8⁺ T-sejtek, de a CD4⁺ T-sejtek is szerepet játszanak. A bevezetésben leírtak alapján azonban úgy gondoltuk, hogy a CD8⁺ T-sejtek jobb kutatási célpontjai lehetnek az aGvHD-ban zajló homingnak, hiszen homingjuk sokkal inkább APC irányított és szöveti belépésük is jobban függ a reprezentált homing markerektől, mint a CD4⁺ T-sejteké.

A fentiek alapján PhD munkám második konkrét célja aGvHD-ban szenvedő betegek és egészséges önkéntesek vérmintáit vizsgálva olyan új, eddig még nem ismert humán homing markerek leírása és vizsgálata volt, amelyek fontosak lehetnek a CD8⁺ T-sejtek szövetspecifikus homingjában, különös tekintettel az aGvHD-ra. A kutatás másodlagos célja annak értékelése volt, hogy ezek milyen prognosztikus, diagnosztikai illetve terápiás, jelentőséggel bírhatnak.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Egér aGvHD modell

4.1.1 Felhasznált egértörzsek

A modell beállítása során az összes egértörzset a The Jackson Laboratory-tól vásároltuk.

Használt törzsek:

8. Táblázat: A kísérletekhez használt egértörzsek

Teljes név	Továbbiakban használt rövid név	Transzgén módosítás lényege:
C57BL/6-Tg(CAG-OVA) 916Jen/J	Act-mOVA	C57BL/6 egerek, melyek valamennyi testi sejtjükben kifejezik a csirke ovalbumint, illetve ennek 254-267 peptidjét (SIINFEKL) az egér MHC I Kb allélvariánsán prezentálják
C57BL/6-Tg(TcraTcrb) 1100Mjb/J	OT-I	C57BL/6 egerek, melyek valamennyi CD8+ citotoxikus T-sejtjének T-sejt receptora az egér MHC I Kb allélvariánsához kötött csirke ovalbumin 254-267 peptiddel (SIINFEKL) aktiválható
B6.SJL-Ptprca Pepcb /BoyJ	CD45.1	C57BL/6 egerek, melyek fehérvérsejtjei a törzsre egyébként jellemző CD45.2 protein helyett annak CD45.1 allélváltozatát fejezik ki, és ezáltal más színgén C57BL/6 gazdába transzferálva is nyomon követhetők
C57BL/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J	UBC-GFP	C57BL/6 egerek, melyek sejtjei zölden fluoreszkálnak a humán ubiquitin C promoterhez kötött enhanced GFP kifejezése miatt, és ezáltal más színgén C57BL/6 gazdába transzferálva is nyomon követhetők

Néhány kísérlet esetében az OT-I egereket visszakereszteltük CD45.1 és UBC-GFP háttérre. Az állatok tenyésztése, tartása és gondozása a SE GSI állatházban, egyedileg szellőztetett ketrecek (IVC) hordozó, szünetmentes táppal védett, GSM/SMS alapú riasztóval ellátott állványokon, HEPA szűrt levegő befúvatással, és 12/12 órás napfény-sötét ciklus mesterséges fenntartása mellett, légkondicionált helyiségekben zajlott. Az állatok szakkereskedelmi forgalomban elérhető (Akronom) GLP certifikált egér fenntartó- és szaporítótápon (VRF-1, Special Diets Services) kukoricacsutka granulátum almon (Rehofix MK2000, JRS), környezetgazdagítás mellett (GLP Des Res Mouse Houses, LBS), táp és ivóvíz *ad libitum* biztosításával, heti kétszeri almozás mellett voltak fenntartva. A kísérletek elvégzéséhez 10-16 hetes nőstény állatokat használtunk. A kísérletet végző személyek mindegyike rendelkezett állatkísérletes engedéllyel, illetve minden vizsgálat az állatok védelméről és kíméletéről elfogadott 1998. évi XXVIII. törvény IV fejezetében, és a 40/2013. (II. 14.) Korm. rendeletben foglaltaknak megfelelően, egyedi projektengedély birtokában történt.

4.1.2 OT-I → OVA akut GvHD modell

A transzplantáció napján (0. nap) a recipiens egerek 11Gy teljes test besugárzást kaptak, 2x 5,5Gy dózisban, a két dózis között 3 órás szünettel. A besugárzás 1,07Gy/perc ütemezéssel, lineáris gyorsítóval történt. A kondicionáláson átesett állatokat még aznap retroorbitális injektálással transzplantáltuk a donortól származó 3×10^6 csontvelői és 1.5×10^7 lép sejtekkel, ketamin-xylazin altatásban. A legtöbb kísérletben B6 háttéren lévő OT-I egereket használtunk aHSCT donorként, és B6 háttérű Act-mOVA állatokat recipiensként (OT-I → Act-mOVA modell). A transzplantációt követően naponta monitoroztuk az aGvHD tüneteinek megjelenését, úgymint az állatok súlyvesztését, apátiáját és szőrzet változását (szőrzetvesztés, borzolás), majd a transzplantációt követő 4. napon CO₂-belégeztetési eutanáziát hajtottunk végre.

A modell működését bizonyító kontroll kísérletek során további recipiens-donor párokat is alkalmaztunk:

- CD8⁺ T-sejt függés tesztelése: Act-mOVA recipiens - CD8⁺ T-sejt depletált OT-I graft
- CD8⁺ T-sejtek *in vivo* követése: Act-mOVA recipiens – CD8⁺ T-sejt depletált OT-I graft, UBC-GFP/OT-I CD8⁺ T-sejtekkel kiegészítve
- Besugárzás hatásának tesztelése: Act-mOVA recipiens – Act-mOVA graft

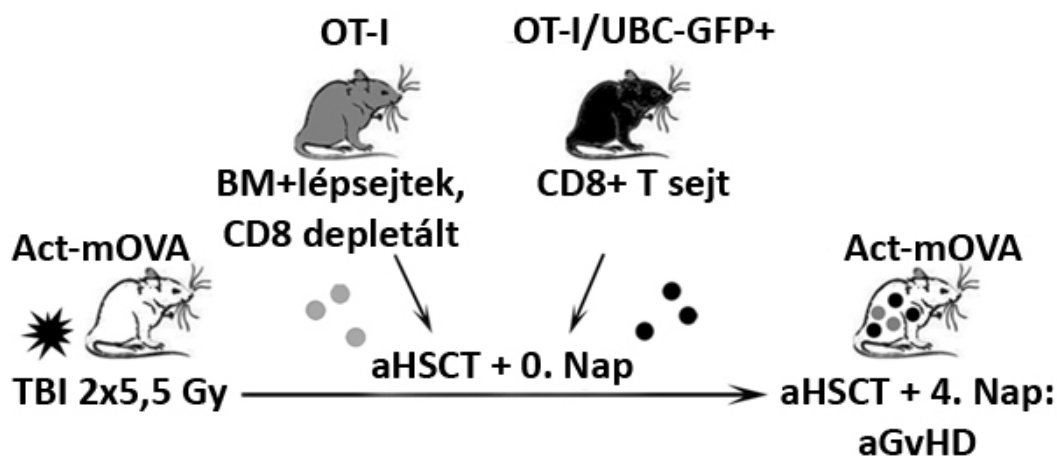
- Minor mismatch (ovalbumin helyett major mismatch MHC) hatásának tesztelése:
B6 recipiens - Balb/c graft

4.1.3 Hisztológia

A hisztológiai vizsgálatokhoz az állatokat a transzplantáció napján (0. nap), illetve a medián túlélés napján, tehát a transzplantációt követő 4. napon áldoztuk fel, és az állatok bőrért, tüdejéért, vékonybeléért és májáért használtuk fel. A szerveket formalinnal fixáltuk és paraffinba ágyaztuk, majd 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket hematoxylin és eosin festésnek vetettük alá. A metszetekről készült felvételeket Nikon Diaphot TMD inverz mikroszkóppal készítettük, 10x objektívvel. A szövettant két független patológus értékelte.

4.1.4 UBC-GFP/OT-I CD8⁺ T-sejtek követése az aGvHD által érintett szövetekben

A T-sejtek követésére Act-mOVA recipienst és UBC-GFP/OT-I donortól származó CD8⁺ T-sejteket, illetve CD8⁺ T-sejt mentesített graftot használtunk. Ezt úgy értük el, hogy a donor OT-I állatból származó graftot MACS depléciával T-sejt mentesítettük, majd a graftot kiegészítettük szintén MACS módszerrel szeparált UBC-GFP/OT-I egerből származó ($1,5 \times 10^6$) CD8⁺ T-sejtekkel. Ezzel a módszerrel elértük, hogy a vizsgálni kívánt graft-eredetű CD8⁺ T-sejtek GFP jelöltek lettek, míg más graft eredetű sejtek és a recipiens sejtjei GFP negatív státuszban maradtak, így megkönnyítve a graft CD8⁺ T-sejtjeinek követését a recipiens állat szervezetében. Ezt követően a recipienst a jelzett időpontokban feláldoztuk, majd tüdejéért, vékonybeléért, bőrért és perifériás vérért vizsgáltuk. A modell működési sémája a **10. Ábrán** látható.



10. Ábra: A donor T-sejtek követésének módszere, az UBC-GFP/OT-I CD8 modellben

A szövetek metszése a hisztológiai pontban leírtak szerint történt. A metszeteket ezt követően Super Frost, Ultra Plus adhezív üveg tárgylemezekre helyeztük és 30 percig, pH=6 nátrium-citrát pufferben forraltuk. Az antigén-feltárást követően az endogén peroxidáz aktivitást 0,5% hidrogén peroxid oldatban való 20 perces inkubálással blokkoltuk. A jelölésre 1:200 hígításban anti-GFP-HRP ellenanyagot használtunk, míg a detekciót Novolink polymer kittel végeztük. A kitet a gyártói utasításoknak megfelelően alkalmaztuk. A GFP jelölt T-sejteket DAB oldattal tettük láthatóvá 3-5 perces mikroszkópos kontroll mellett.

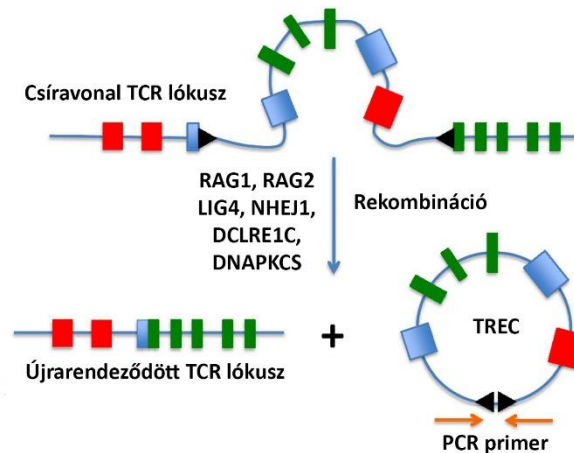
4.1.5 CD45.1/OT-I CD8+ T-sejtek kinyerése automatizált szöveti disszociációval és sejt szortolással

A CD45.1/OT-I donor rendszerben a recipiens továbbra is Act-mOVA törzs volt, míg a donor esetében, az alaphelyzetben CD45.2 háttérű OT-I graft CD8+ T-sejtjeit CD45.1 háttérű OT-I donorból származó CD8+ T-sejtekkel helyettesítettük (A lépések UBC-GFP/OT-I modell esetében leírtaknak megfelelően történtek). A transzplantációt követő 4. napon az állatokat felboncoltuk, és a vékonybelüket, tüdejüket és májukat Miltenyi gentleMACS™ Dissociator, automatizált szöveti disszociátorral és a Miltenyi Mouse Lamina Propria Dissociation, Mouse Lung Dissociation, és Mouse Tumor Dissociation kits) kitek használatával dezintegráltuk, a gyártói utasításoknak megfelelően. Ezt követően a nyers szöveti sejtszuspenziókból a leukocitákat 40/80% Percoll grádiens fugálással különítettük el. Végül a CD45.1/OT-I CD8+ T-sejteket biotinilált anti-CD45.1 antitest és anti-biotin mikrogöngy segítségével, automatizált AutoMACS Pro szorteren, kétoszlopos pozitív szelekciós (posselds) program segítségével izoláltuk.

4.1.6 ELISA

Az ELISA vizsgálatokhoz a transzplantáció 0. napján a graftból (kontroll) illetve a transzplantációt követő 4. napon a recipiens Act-mOVA állat perifériás véréből, tüdejéből, vékonybeléből és májából (aGvHD) izoláltunk CD45.1/OT-I CD8+ T-sejteket, a fentiekben leírt MACS módszerrel. Az így kinyert T-sejteket 10^4 - 10^5 sejt/well sűrűségben, 96 lyukú plate-re helyeztük, 10% FBS, 1% Glutamin tartalmú RPMI 1640 médiumban, majd 48 órán keresztül, +37°C-os termosztátban, 5% CO₂ atmoszférában tartottuk fent őket. Ezt követően a kultúrák felülúszóját vizsgáltuk Granzim B ELISA kit segítségével, a gyártói utasításoknak megfelelően. Az eredményeket Multiskan MS ELISA reader segítségével olvastuk le, és a sejtszámra normalizáltuk.

4.1.7 TREC assay



11. Ábra: A T-sejt receptor excíziós körök (TREC) sematikus folyamata

Először Kong és mtsai használták fel a tímikus funkciók vizsgálatára. A timuszban történő TCR gén átrendeződés során, melléktermékként számos extrakromoszómális DNS keletkezik, melyek a továbbiakban nem replikálódnak és a T-sejtek osztódásai során számuk csökken, tehát fokozatosan kihígulnak. Ezeknek a T-sejt receptor kivágási köröknek a száma valós idejű PCR-el kvantitatívan meghatározható, így könnyen elkülöníthetővé válik a naív fenotípusú T-sejt az expanszió átesett effektor T-sejttől (159-161).

A TREC assay kontrolljának a transzplantáció napján a graftból származó, a fentiekben leírt MACS módszerrel szortolt CD45.1/OT-I CD8⁺ T-sejteket használtuk. Ezt követően a transzplantációt követő 4. napon pedig az akut GvHD-t mutató recipiens Act-mOVA állat perifériás véréből, tüdejéből, vékonybeléből és májából izoláltunk, szintén MACS módszerrel CD45.1/OT-I CD8⁺ T-sejteket. A genomiális DNS-t NucleoSpin Blood kit segítségével izoláltuk, majd a TREC számát Q-PCR segítségével mértük le. A TREC-ek felamplifikálására az alábbi primer párt és TaqMan próbát használtuk:

- Forward primer: 5-CCAAGCTGACGGCAGGTTT-3
- Reverse primer: 5-AGCATGGCAAGCAGCACC-3
- TaqMan próba: FAM-5-TGCTGTGTGCCCTGCCCTGCC-3-TAMRA

Az amplifikációhoz Platinum Quantitative PCR Super Mix kitet, egy Applied Biosystems 7900 HT RT PCR gépet, és az alábbi protokollt használtuk: +95°C 10 perc, majd +95°C 15 másodperc, +95°C 1 perc, összesen 45x ismételve. A referencia az Applied

Biosystems TaqMan Transferrin Copy Number Reference Assay volt. Az eredményeket az összehasonlító CT ($\Delta\Delta CT$) módszerrel értelmeztük.

4.1.8 Áramlási citometria

Az áramlási citometriás vizsgálataink során az alábbi ellenanyagokat, az ellenanyagoknak megfelelő izotípus kontrollokat és viabilitási festéket használtuk: CD8 β PE-Cy7, CD45.1 FITC, granzim B FITC, IFN gamma FITC, LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit. Az intracelluláris jelölésekhez pedig a Cytofix/Cytoperm kitet használtuk. A méréseket FACS Calibur áramlási citométerrel végeztük, az adatokat FlowJo szoftverrel értékeltük.

4.1.9 Génexpressziós vizsgálat

A vizsgálathoz MACS-szortolt CD45.1/OT-I CD8⁺ T-sejtekből, RNeasy Plus Micro Kit segítségével total RNS-t izoláltunk. Az RNS integritásának és mennyiségének meghatározása Agilent 2100 Bioanalyzer készülék segítségével történt. Mintánként 3000pg totál RNS lett reverz transzkripcióval átírva, majd az így kapott cDNS Arcturus RiboAmp PLUS kit segítségével két körben került amplifikációra, majd Cy3 labeling kit segítségével jelölve. Az amplifikált és jelölt minták ezt követően 4x44K egér teljes genom mikroarrayhez lettek hibridizálva és Agilent Microarray Scannerrel szkennelve. A nyers adatokat Feature Extraction szoftver segítségével nyertük ki, majd GeneSpring szoftverrel analizáltuk. Az adatokat először kvantilis normalizáltuk, majd az alapvonalat a minták mediánjánál húztuk meg. A nem detektálható, illetve az összes mintát nézve a 20. percentilisének magasabb jelintenzitású mintákat kizártuk. Ezt követően a megmaradt gén szettét főkomponens analízisnek vetettük alá, illetve tovább vizsgáltuk különböző módon expresszálódó géneket keresve. Csak azok a gének maradhettek a továbbiakban a listán, amelyek nagyobb, mint 2x fold change értéket mutattak a 0. napi és 4. napi minták összevetése során, egyutas ANOVA és Benjamini-Hochberg korrekció elvégzését követően. A szignifikancia érték $p < 0,05$ volt. Az így létrejött gén szetten további Tukey páros analízist végeztünk, $p < 0,05$ szinten, hogy megtaláljuk azokat az eltérő módon expresszálódó géneket, amelyek megugorják a szelekciós kritériát legalább a lehetséges négy páros összehasonlítás egyikében. Ezt követően az adatokat GSEA analízisnek vetettük alá, majd a kiválasztott géneket heatmap-en is ábrázoltuk. A heatmap-eket a BRB Array Tool szoftver Heatmap Viewer funkciójával készítettük. A Mikroarray nyers adatokat GEO adatbázisba töltöttük fel (GSE79083).

4.1.10 Statisztikai analízis

A génexpressziós analízis esetén az elemzést GeneSpring és BRB Array Tools szoftvereket használtunk, míg a többi analízist Graphpad szoftver segítségével végeztük. Az elemzések során egyutas ANOVA-t, Benjamini-Hochberg FDR korrekciót, illetve az egyes kísérletes csoport-párok összevetésére Tukey páros post hoc tesztet alkalmaztunk. Az eredményeket, hacsak máshogyan nem jeleztük, $p < 0,05$ érték esetén tekintettük szignifikánsnak.

4.2 CD8+ T-sejt homing markerek vizsgálata

4.2.1 Szövetminták

A humán bőr-és bél biopsziák a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikával illetve az Uzsoki Kórházzal való együttműködés keretében, a Klinika és a Kórház beteganyagából kerültek beszerzésre. A patológusok által betegségmentesnek nyilvánított szövetminták begyűjtése a Klinika és a Kórház belső IRB-je és a TUKEB által jóváhagyott protokoll szerint történt.

4.2.2 Vérminták

A vérminták begyűjtése a Dél-Pesti Centrumkórház, Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet, Hematológiai és Össejt-transzplantációs Osztályával való együttműködés keretein belül történt, szintén a Kórház beteganyagából. A folyamat a TUKEB által kiadott, beavatkozással nem járó mintagyűjtésre vonatkozó engedélyével, az IRB által jóváhagyott protokoll szerint valósult meg. Összesen 40 aHSCT-n átesett beteg került bevonásra a következő elrendezésben:

- Olyan betegek, akiknél a transzplantációt követő 100. napig nem alakult ki aGvHD (kontroll, n=10)
- Olyan betegek, akiknél után aGvHD alakult ki (n=10)
- Olyan betegek, akiknél gasztrointesztinális aGvHD alakult ki (n=10)
- Olyan betegek, akiknél után és gasztrointesztinális aGvHD együttesen, egyidejűleg alakult ki (n=10)

A minták begyűjtése mindig az aGvHD kialakulásának, illetve diagnosztizálásának időpontjában történt, mielőtt annak terápiás ellátása megkezdődött volna. Az aGvHD nélküli kontroll csoportban, vagyis azon betegek esetében, akikben nem alakult ki az aGvHD egyik szervi változata sem a transzplantációt követő 100. napig, a minták

gyűjtése a transzplantációt követő 30+/-5. napon történt, ami az aGvHD átlagos manifesztációs időpontjának felel meg. Az aHSCTs betegek mellett egyéb, főként validálási célú kísérletekhez aHSCT-n át nem esett egészséges önkéntes véradóktól is gyűjtöttünk mintákat (n=10). A mintagyűjtés során mindig 2x9 ml ACD-A és 2x4 ml EDTA cső vért vettünk le a betegektől, illetve az egészséges önkéntesektől. A betegek adatai a GEO adatokkal együtt feltöltve találhatóak.

4.2.3 PBMC izolálás

A kísérletek elvégzéséhez a vérmintákból első lépésként PBMC-ket izoláltunk. A sejtek izolálását mindig az ACD-A csőben kapott mintákból végeztük, mert ez a cső az ideális a T-sejtek túlélése szempontjából, illetve a funkcionális tesztek elvégzéséhez. A vérmintákat a vérvétel és az izolálás között szobahőmérsékleten tároltuk, az izolálást Ficoll-os sűrűség grádiens centrifugálással végeztük, a sejtek számát és életképességét tripánkék festéssel határoztuk meg és ellenőriztük. Az izolálást követő medián sejthozam 1.3×10^6 PBMC/ml, míg a viabilitás 95% feletti volt. Ezt követően az izolált PBMC-t 90% FBS, 10% DMSO tartalmú fagyasztó pufferben először Mr. Frosty fagyasztó konténerben, 6 óra alatt, -80°C -ra fagyasztottuk, majd -190°C -os folyékony nitrogéngőzben tároltuk.

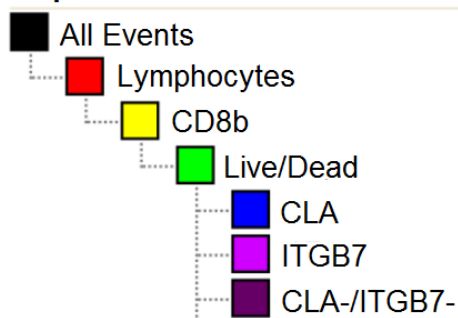
4.2.4 FACS szortolás

FACS szortoláshoz a PBMC felolvasztása az irodalomban már leírt protokoll alapján történt (162), majd a felolvasztást követően azonnal megtörtént a minták jelölése, a következő markerek, illetve gating stratégia felhasználásával (12. Ábra):

Jelölés:

- Viabilitás, LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain, Near-IR
- Anti-humán CD8 β , APC
- Anti-humán CLA, FITC
- Anti-humán ITGB7, PE

Population



12. Ábra: Szortolási gating stratégia

A fenti megközelítést alkalmazva egy BD FACS Aria III szorter és a FACSDiva szoftver segítségével három különböző CD8⁺ T-sejt szubpopulációt különítettünk el három-irányú egyidejű szortolás segítségével.

- Bőr-irányú homingot mutató CD8⁺ T-sejtek (Ly/LIVE/DEAD®-/CD8β+/CLA+)
- Bél-irányú homingot mutató CD8⁺ T-sejtek (Ly/LIVE/DEAD®-/CD8β+/ITGβ7+)
- Sem bőr-, sem bél-irányú homingot mutató, referencia CD8⁺ T-sejtek (Ly/LIVE/DEAD®-/CD8β+/ITGβ7-/CLA-)

A szortoláshoz a T-sejtek számára ideális 90% HBSS w/o, 10% FBS szort puffert használtunk. A sejtek viabilitása > 95% volt, és a szortolt T-sejteket közvetlenül lízis pufferbe (RLT Plus lysis puffer) izoláltuk, amelyben további felhasználásig -80°C-on tároltuk őket.

4.2.5 Microarray génexpressziós vizsgálat

A szortolt mintákból első lépésben totál RNS-t izoláltunk, RNeasy Plus Micro Kit segítségével, amely integritását és mennyiségét Bioanalyzer 2100 készülékkel és RNA 6000 Pico Kit és chip segítségével ellenőriztük. Mivel mintáink az ultra alacsony RNS input tartományba esetek, ezért a további array-vizsgálatokhoz mintánként 3000pg totál RNS-t egy különösen nagy érzékenységgű Arcturus RiboAmp HS Plus, két körös amplifikáló kit segítségével amplifikáltuk. Az így kinyert 5-30ng amplifikált cRNS tisztaságát és mennyiségét újra ellenőriztük, majd Cy3 labeling kit segítségével jelöltük. A jelölt mintákat humán GE 4x44K v2 teljes genom microarrayekhez hibridizáltuk, majd egy Agilent Microarray Scanner segítségével szkenneltük. A nyers adatokhoz Feature Extraction szoftver (Agilent) segítségével jutottunk. Az adatok statisztikai elemzése előtt először a különböző körökben elvégzett hibridizáció okozta batch effektust küszöböltük ki DWD (distance weighted discrimination (163)) segítségével. Az adatok elemzése ezt követően, a BRB-Array Tools szoftver segítségével történt. Az adatokat először kvantilis normalizáltuk, majd a további analízisből minden olyan gént kizártunk, amelyek átlagos szignálintenzitása $\log_2=1$ alatti volt, amelyek akár negatív akár pozitív irányban nem mutattak legalább kétszeres fold change értéket, legalább egy kísérleti csoportban az adott gén középértékéhez képest, vagy nem voltak kimutathatóak legalább egy kísérleti csoport minden mintájában. A fenti kizárásokat követően összesen 1981 fennmaradó gént vontunk be statisztikai elemzésbe, amelyeket kétutas ismétléses ANOVA-val és

Benjamini-Hochberg korrekcióval elemeztünk (FDR <0.01). A microarray nyers adatokat GEO adatbázisba töltöttük fel (GSE65045), mely az idei évtől mindenki számára hozzáférhető.

4.2.6 Q-PCR

Az előzőekben leírtak szerint a FACS szortolt CD8⁺ T-sejtekből először totál RNS-t izoláltunk majd reverz transzkripciót hajtottunk végre. Az így nyert cDNS mintákon specifikus TaqMan próbával és HGPRT kontrollal elemeztük a vizsgált gének expresszióját a különböző T-sejt szubpopulációkban, illetve a különböző betegcsoportokban. A PCR reakciókat 7900HT Fast Real Time PCR készüléken, 2xSensifast Probe HI-ROX master mix segítségével végeztük. Az eredményeket az összehasonlító CT ($\Delta\Delta CT$) módszerrel számoltuk ki.

4.2.7 Áramlási citometria

Számos kísérletünkben alkalmaztunk áramlási citometriát, melyhez a vizsgált CD8⁺ T-sejteket a következő ellenanyagokkal festettük: CLA-FITC, IFN- γ -FITC, Integrin β 7-PE, PI16-PE, CCR10-PE, CCR4-PE, CCR8-PE, CD8 β -APC, CD8 β -PECy7, CD3-APC, CD59-FITC, CD14 PerCP-Cy5.5, CD56-APC, granzim-B-FITC, CD69-FITC, CD127-FITC, CD25-PerCP-eFluor710, CD45RO PerCP-eFluor710, PI16-APC. A sejteket festés előtt minden esetben az ellenanyagnak megfelelő szérummal blokkoltuk. Az ellenanyagokat a protokolljuk szerint és a megfelelő izotípus kontrollal összevetésben alkalmaztuk. Intracelluláris jelölés esetén a sejtek átjárhatóságát Fixation/Permeabilization Solution alkalmazásával biztosítottuk, szekretált intracelluláris fehérjék esetén pedig ezt megelőzően az endoplazmatikus retikulumból a Golgi irányába zajló fehérje transzportot pedig Brefeldin-A használatával gátoltuk. A méréseket FACSCalibur készüléken, az adatok elemzését pedig FlowJo v10.1 szoftver segítségével végeztük.

4.2.8 MACS szortolás

A microarray génexpressziós vizsgálatok kivételével az összes CD8⁺ T-sejt vizsgálatot a Miltenyi AutoMACS Pro mágneses sejt szeparátorának segítségével végeztük. A CD8⁺ T-sejtek izolálása a PBMC antitestekkel illetve paramágneses szeparáló gyöngyökkel való jelölését követően történt. A PBMC mintákat először anti-humán CD8 β APC ellenanyaggal jelöltük, majd anti-APC multisort mikrogöngyöket adtunk a mintákhoz. A szeparálás egy két oszlopos pozitív szelekció volt, a tisztaság vs. kitermelés közül az

előbbi nagymértékben előnyben részesítő posselds programon. A további kísérletek elvégzése előtt a multisort paramágneses gyöngyöket a sejtek felszínéről release reagens használatával eltávolítottuk. Az izolátum tisztaságát előkísérletekben, a CD8 β APC pozitív sejtek arányát flow citometriásan ellenőrizve azt > 95%-nak találtuk.

4.2.9 Immuncitokémia

A MACS-szortolt CD8 β + T-sejteket festés előtt egér és patkány szérummal blokkoltuk, majd a blokkolást követően anti-humán CLA-FITC, PI16-PE és CD8 β -APC ellenanyagokkal jelöltük. Az APC jelet anti-APC-biotin és Streptavidin-APC használatával erősítettük. A festést követően a sejteket a tárgylemezre citofugálással juttattuk, majd DAPI festéket tartalmazó Fluoroshield fixáló fedőréteggel vontuk be a mintákat. A mintákat fénytől védve over night, szobahőmérsékleten szárítottuk, majd az így elkészült metszeteket FV500 konfokális pásztázó mikroszkóppal, 60X nagyításban vizsgáltuk. Az elkészült képeket ImageJ v1.8.0_112 szoftver segítségével elemeztük.

4.2.10 Immunhisztokémia

Az egészséges humán bőr biopsziákból nyert, formalin-fixált és paraffinba ágyazott mintákból származó 5 μ m-es vastagságú metszeteken először antigén feltárást végeztünk. A feltárást nátrium-citrát pufferrel (pH=6) 105^oC-on, 30 percig végeztük. Ezt követően a metszeteket 10% FBS-el blokkoltuk, majd jelöltük. A jelölést CLA-FITC (1:10), CD8 β (1:50) és PI16 (1:100) ellenanyagokkal végeztük. A direkt CLA jelölés mellett az indirekt jelöléshez a CD8 β esetén anti-egér IgG eFluor570 (1:100), míg a PI16 esetén anti-nyúl IgG-APC másodlagos ellenanyagokat használtunk. Indirekt festések esetében festési kontrollnak az elsődleges ellenanyagot elhagyva, csak a másodlagos ellenanyagokat használtuk. Az elkészült metszeteket FV500 konfokális pásztázó mikroszkóppal, 20X nagyításban vizsgáltuk majd a képeket ImageJ v1.8.0_112 szoftver segítségével elemeztük.

4.2.11 GPI horgony emésztés

A MACS szortolt CD8 β + T-sejteket kétszer mostuk 1xPBS-ben, majd ezt követően 1x10⁶ sejt/500 μ l sejtkoncentráció mellett különböző koncentrációjú *B. cereus* PI-PLC-re exponáltuk, megfelelő kezeletlen kontrollok mellett. A PI-PLC kezelést szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül végeztük. Ezt követően a mintákat azonnal jelöltük anti-humán CD59 FITC (pozitív kontroll), CD8 APC (negatív kontroll), illetve a

vizsgálni kívánt PI16 PE ellenanyaggal. Az áramlási citometriás mérés illetve az adatok elemzése a már említett módon történt.

4.2.12 1,25-dihydroxivitamin D3 és retinsav kezelés

A MACS szortolt CD8 β + T-sejteket 7×10^5 sejt/well sűrűségben, teljes médiumban (RPMI 1640, 10% human AB szérum, 1% glutamin, 1% penicillin/sztreptomycin) 24 lyukú plate-re helyeztük, majd két napig 2,5ng/ml rekombináns humán IL-12 jelenléte mellett, 1:3 sejt:bead arányban alkalmazott CD3/CD28 Dynabeadekkel aktiváltuk. Az aktivációt követően a CD8 β + T-sejt kultúrákat 12,5 ng/ml rekombináns humán IL-2-vel egészítettük ki, majd három aliquotra osztottuk. Az első párhuzamos 10^{-8} M retinsav, a második 10^{-8} M 1,25-dihydroxivitamin D3, míg a harmadik, a kontrollként szolgáló CD8 β + T-sejt kultúra csak oldószer/segédanyag, azaz 0.1% etanol kezelést kapott. Az aktivációt követő 10. napig a kultúrákat kétnaponta két részre osztottuk. Az első fél új médiumot kapott az összes kezelésre alkalmazott hatóanyag friss kiegészítésével és további fenntartásra került, míg a kultúra másik fele áramlási citometriás analízisnek lett alávetve.

4.2.13 CD8+ T-sejt és bél organoid/bőr explantátum ko-kultúrák

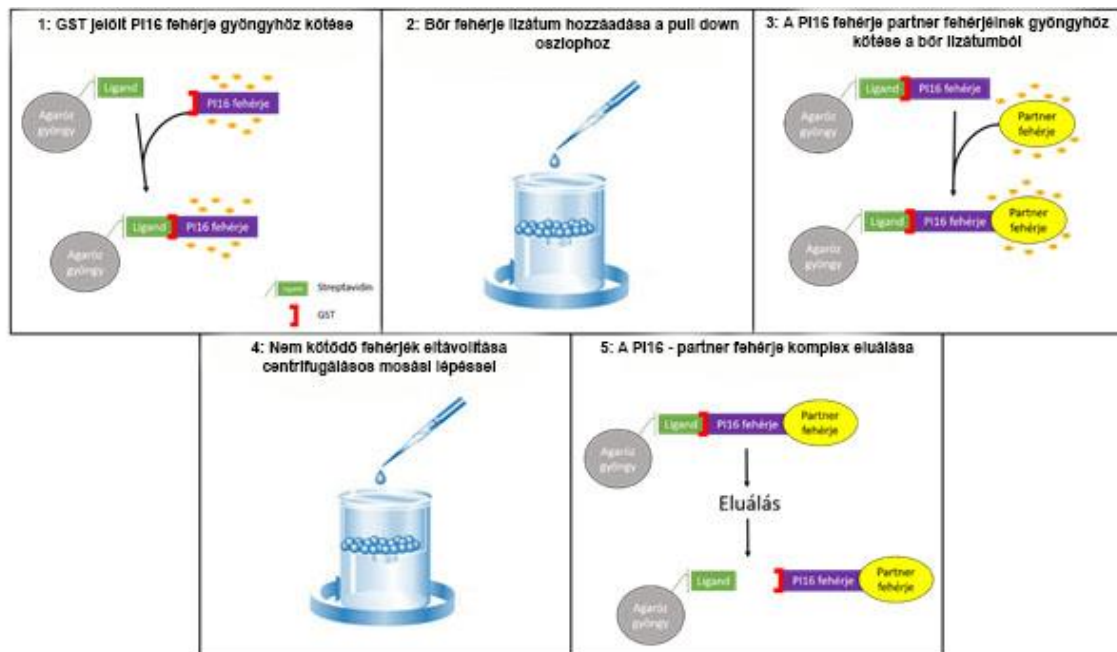
Az előzőekben leírt MACS-szortolt és aktivált T-sejteket 7×10^5 sejt/well sűrűségben, egy 24 lyukú plate-re helyeztünk, majd a well-ek fölé 0.4 μ m pórusátmérőjű transwell insert-eket helyeztünk. A továbbiakban a CD8+ T-sejteket ennek a Transwell rendszernek az alsó, míg a velük kokultúrában tartott bőr és bélszövetet, a felső kamrában tartottuk fent. Ehhez elsőként a CD8+ T-sejteket 4 részre osztottuk: 1) kezeletlen CD8+ T-sejt, 2) aktivált CD8+ T-sejt, 3) CD8+ T-sejt bőr kokultúrában, 4) aktivált CD8+ T-sejt bél kokultúrában. Bőr explantátum esetén, a CD8+ T-sejt aktiváció 2 napjának letelte után az egészséges humán bőrből származó biopsziákat 3-4 kisebb darabra vágtuk, és a transwell rendszer felső kamrájába helyeztük. A bőr explantátumokat ezután, a folyadék/légfázis határán, 4 napig tartó inkubációban, 50 μ l, 10% human AB szérum, 1% penicillin/sztreptomycin tartalmú RPMI 1640 médiumban tartottuk fent, a CD8+ T-sejtekkel. A bélszövettel való CD8+ T-sejtes kokultúra céljára 3D-s bél organoidok létrehozása történt meg az irodalomban már leírásra került protokoll alapján, egészséges vastagbél mintákból kiindulva (164). Röviden, a Lieberkühn mirigyek izolációja hideg 2mM EDTA segítségével, vastagbél biopsziákból történt, majd az izolátumokat 40 μ l Matrigelbe ültettük, és ezt helyeztük a transzwell rendszer felső kamrájába. Ezt követően

400µl, 5% FBS, 1x Glutamax, 1× N-2, 1× B-27, 10 mM HEPES, penicilin/streptomycin, 1 mM acetilcisztein, 500 nM A-83-01, 10 µM SB202190, 10 nM [Leu15]-Gastrin I, 50 ng/ml hr EGF, 100 ng/ml h noggin, 100 ng/ml Wnt3A és 500 ng/ml h R-Spondin1-al kiegészített DMEM médiumot adtunk a Matrigel tetejére. Végül a Matrigelbe ágyazott bél organoidokat is a Transwell insertek tetejére helyeztük, és 4 napon keresztül koinkubáltuk a CD8⁺ T-sejtekkel. Kétnaponta a bőr explantátumok, illetve a bél organoidok médiumát lecseréltük, míg az alsó Transwell kamrában lévő CD8⁺ T-sejteket kétfelé osztottuk. A CD8⁺ T-sejtek egyik fele új médiumot kapott, míg a másik felét az előzőekben leírtak szerint, áramlási citometriás vizsgálatnak vetettük alá.

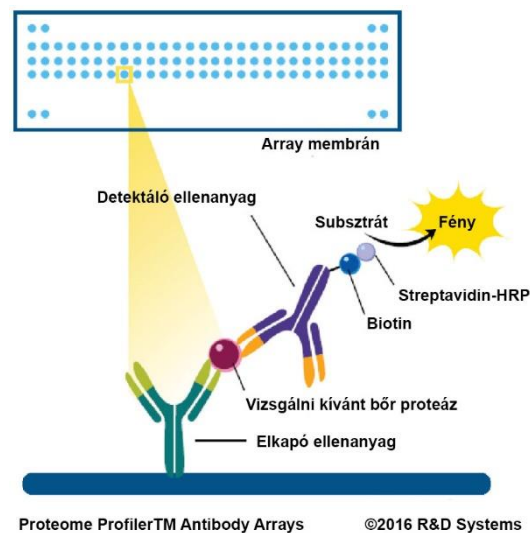
4.2.14 PI-16 Pulldown assay, és a lekötött proteázok azonosítása

Azon bőr proteázok izolálására, amelyek a PI16 proteáz inhibitor interakciós partnerei lehetnek, pull-down assayt alkalmaztunk. Ehhez elsőként egészséges bőr biopsziákat gyűjtöttünk be, melyekből protein lizátumokat képeztünk. Ennek érdekében a bőr biopszákat kimetszésük után elsőként azonnal Halt™ Protease inhibitor koktéllal kiegészített ProteoJet Mammalian Cell lízis reagensbe helyeztük, majd 30 percig 4°C-on inkubáltuk. Ezt követően a szubkután zsírt eltávolítottuk, majd a mintákat steril szikével 1-3mm nagyságú darabokra vágtuk. Végül Diax 100 homogenizátorral homogenizáltuk, majd az oldhatatlan sejtörmeléket és csapadékot centrifugálással eltávolítottuk. Az így izolált bőr-eredetű protein lizátumot a további felhasználásig -80°C-ra fagyasztva raktároztuk. A bőr lizátumon elvégzett, a PI16-ot mint csalit alkalmazó pulldown assay elvégzéséhez első lépésben a 10µg mennyiségű, GST taggelt, humán rekombináns PI16 fehérjét a protein glutation-mentesítése érdekében dializáltunk egy Slide-A-Lyzer dialízis kazetta segítségével. Az így megtisztított PI16 fehérjét a GST Protein Interaction Pull-Down Kit segítségével glutation-kapcsolt agaróz beadekhez kötöttük. Végül a pull-down assay során 100µg bőr fehérje lizátumból a beadhez kötött PI16, mint csali segítségével a hozzá kapcsolódó bőr proteineket kötöttük le, a folyamatot a gyártói utasításoknak megfelelően végezve. Az aspecifikus kötődés mértékének felmérésére kontrollként üres, PI16-ot nem hordozó beadeket használtunk. Ezt követően a specifikusan lekötött proteázok azonosítása érdekében a pulldown, azaz specifikusan lekötött, és az átfolyó, nem kötődő fehérjefrakciókat vetettük össze a PI16-ot hordozó és nem hordozó gyöngyök használata során. Ehhez az egyes frakciókat a Proteome Profiler™ Human Protease Array Kit segítségével vetettük össze, mely számos bőr proteáz egyidejű azonosítására, és

menntiségeik szemikvantitatív összevetésére alkalmas rendszer. A proteáz array használata során a mintaelőkészítés, a membrán inkubáció és az analízis is a gyártói utasításoknak megfelelően zajlott. A protease array eredményeinek denzitometriás kiértékelése a FluorChem Alphaview szoftver segítségével történt.



13. Ábra: A PI16 protein-pull-down vizsgálat sémája



14. Ábra: A pull-down kísérletben talált bőr-proteázok azonosítása proteom profiler array segítségével

4.2.15 Proteáz inhibitor assay

A vizsgálat elvégzéséhez az előzőekben leírtak szerint a GST taggelt rekombináns PI16 fehérjét (25µg) dializáltuk annak érdekében, hogy az inhibitor assay jel inteferáló glutation tartalmát eltávolíthassuk. A tisztított PI16 fehérje, katepszin K és MMP-2 proteáz inhibitor aktivitását ezután annak különböző hígításaiban teszteltük egy katepszin K Inhibitor Screening Kit és egy MMP2 Inhibitor Screening Assay Kit segítségével. A vizsgálatokat a gyártói utasításoknak megfelelően, duplikátumokban végeztük. Az eredmények kiértékelését a katepszin K inhibíció esetében egy Labsystems Luminoskan reader segítségével, míg az MMP-2 inhibíció esetén egy Labsystems Multiskan MS spektrofotométer segítségével végeztük.

4.2.16 Statisztikai analízis

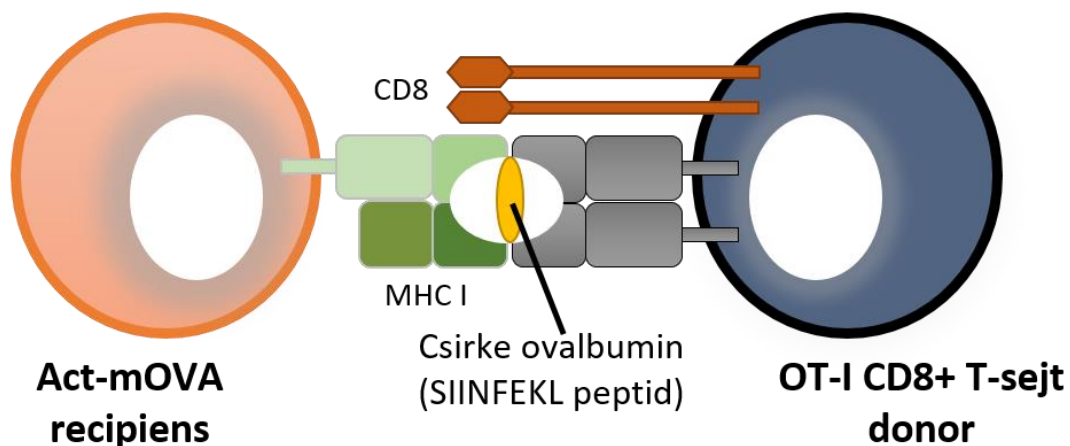
A microarray eredmények kiértékelése során az elemzést BRB Array Tools, míg az egyéb kísérletek eredményeinek értékelését a Graphpad szoftver segítségével végeztük. Az elemzések során Student-féle párosított T tesztet, kétutas-és egyutas ismétléses ANOVA-t, illetve többszörös összehasonlításokban Benjamini-Hochberg FDR korrekciót alkalmaztunk. Az eredményeket, ha csak máshogyan nem jeleztük, $p < 0,05$, illetve FDR $< 0,05$ érték esetén tekintettük szignifikánsnak.

5. EREDMÉNYEK

5.1 Act-mOVA/OT-I akut GvHD egérmodell felállítása után és bél-irányú homingot folytató CD8⁺ T-sejtek összehasonlító vizsgálatára

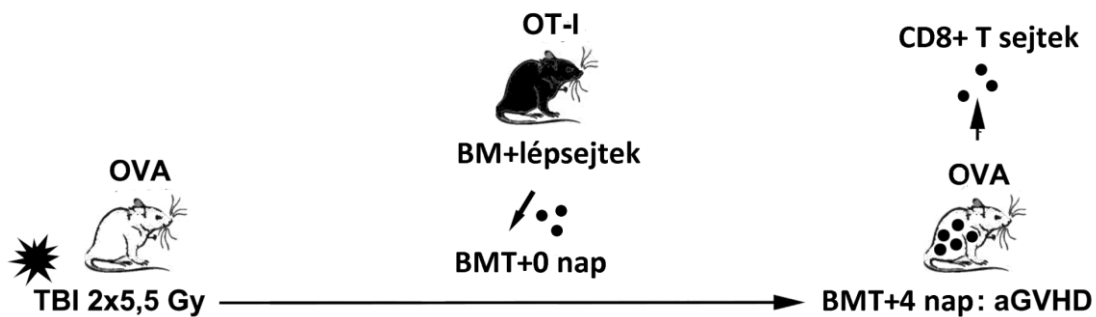
5.1.1 Az Act-mOVA/OT-I modell munkakoncepciója

A modell felállításához két transzgenikus, egyetlen miHA eltérést mutató, máskülönben szingenikus egértörzset kívántunk felhasználni. aH SCT donorként C57Bl/6 OT-I állatokat használtunk, amelyek olyan módosított CD8⁺ T-sejt receptorral (TCR) rendelkeztek, amely a csirke ovalbumin OVA²⁵⁴⁻²⁶⁷ peptidjére (SIINFEKL) specifikus. Recipienseként pedig C57Bl/6 Act-mOVA, más néven CAG-OVA egerek alkalmaztunk, amelyek csirke béta-aktin promóter és CMV enhanszer szabályozása mellett, membrán kötött formában, minden testi sejtben ubikviter módon expresszálják a csirke ovalbumin transzgént, és MHC I-n (H2^{kb}) keresztül prezentálják annak SIINFEKL peptid epitópját (**15. Ábra**). Feltételeztük, hogy ebben a donor-recipiens párosításban a donor CD8⁺ T-sejtek tömeges, és minden szervre kiterjedő miHA (ovalbumin) alapú antigénfelismerése megfelelő stimulus lesz egy minden lehetséges aGvHD-s célszervet érintő reakció kiváltására. Feltételeztük, hogy ezáltal egy a humán MUD transzplantációban kialakuló bőr- és bél aGvHD-t egyaránt leképező, és a hagyományos modellekkel szemben a Bevezetés és Célkitűzések c. fejezetben leírtaknak megfelelően, jelentős további előnyökkel rendelkező aGvHD-s egérmodell kialakítására nyílik lehetőségünk.



15. Ábra: Az OVA/OT-I felismerés

A modell felállításához az aHSCT előtt a recipiens állatok kondicionálására letális TBI-t használtunk összesen 11 Gy dózisban, a bélkárosodás csökkentése végett 2 részletben alkalmazva, 3 órás szünettel a két részlet között. A kondicionálást követő 6 órán belül, 3×10^6 csontvelői- és 1.5×10^7 lépsejt retroorbitális úton való beadásával megtörtént a HSCT (**16. Ábra**). A retroorbitális injektálást annak könnyű kivitelezhetősége, reprodukálhatósága, és az erőteljesebb, minden szervre kiterjedő aGvHD elérése miatt választottuk (124, 165).



16. Ábra: Az Act-mOVA/OT-I aGvHD modell alapja

A transzplantációt követő 2.-3. napon belül a modellben valóban megfigyelhetőek voltak a klasszikus egér aGvHD modellektől elvárható, jellemző aGvHD-szerű tünetek (121), mint a hasmenés, apátia, szőrborzolás és a púpos testtartás, ám a K14-OVA modellre jellemző szőrhullást (129) nem tapasztaltuk. A modellre a továbbiakban Act-mOVA/OT-I modellként hivatkozunk.

5.1.1.1 Az Act-mOVA/OT-I modellben CD8+T-sejt függő, letális, aGvHD-szerű kórfolyamat alakul ki

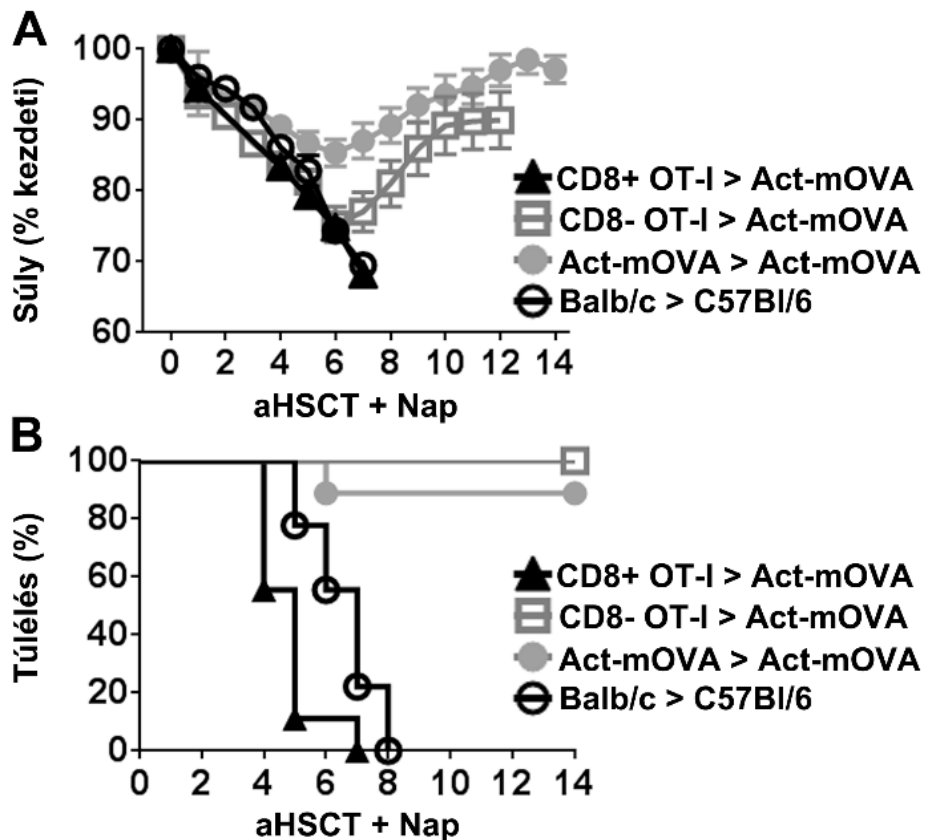
A modellrendszer további vizsgálata előtt, elsőként több kontrollkísérletet végeztünk annak igazolására, hogy a) a kialakuló tünetek valóban a graft CD8+ T-sejtjei, azaz nem a minden egérben meglévő, kisszámú, ovalbumin-specifikus naiv CD4+ T-sejtje, vagy egyéb immunrendszeri elemei által kiváltott immunválasz következményei, b) nem a besugárzás okozta csontvelődefektus következményei, amiket egy szingén HSCT is kiváltana, illetve c) annak vizsgálatára, hogy a miHA mismatch modellünkben kiváltott aGvHDs tünetek dinamikája hogyan viszonyul a klasszikus modellekben, major antigén (MHC) mismatch esetén kialakuló aGvHD-s kórfolyamathoz. Ezeknek a kontroll kísérleteknek a során a fentiekben leírt, immunkompetens és mi-HA specifikus CD8+ T-

sejteket tartalmazó graftot kapó recipiensek (CD8⁺ OT-I → Act-mOVA) reakcióját összevetettük

1. immunkompetens, de a mi-HA specifikus CD8⁺ T-sejtektől MACS deplécióval mentesített, azonban minden egyéb komponensében azonos, kisszámú mi-HA-specifikus CD4⁺ T-sejtet is tartalmazó graftot kapó recipiensek (CD8⁻ OT-I → Act-mOVA) reakciójával
2. immunkompetens, de sem miHA-specifikus CD8⁺ T, sem CD4⁺ T-sejtet nem tartalmazó, szingén graftot kapó recipiensek (Act-mOVA → Act-mOVA) reakciójával
3. immunkompetens, de MHC-specifikus CD8⁺ T-sejteket tartalmazó graftot kapó recipiensek (BALB/c → C57BL/6) reakciójával

Ezeknek a kísérleteknek a során az állatok súlyát és túlélését a transzplantáció napjától két hétig monitoroztuk (**17A és B Ábra**). A **18A Ábrán** jól követhető, hogy a CD8⁺ OT-I → Act-mOVA modellben gyors súlyvesztés, és az állatok legkésőbb 7. napon bekövetkező pusztulása volt megfigyelhető, melynek során a medián túlélés a transzplantációt követő 4. napra esett (**17B Ábra**). A kórfolyamat számos kísérletben nagyon jól reprodukálható volt, egyetlen állat sem nyerte vissza súlyát, illetve egyik állat sem élte túl a transzplantációt követő 8. napot. A letális aGvHD kialakulása az OT-I CD8⁺ T-sejtek bevitelének hatására jött létre, és nem a kisszámú OVA-reaktív CD4⁺ T-sejt, vagy egyéb immunrendszeri elem révén, mivel a CD8⁺ T-sejtek depléciója (CD8⁺ OT-I → Act-mOVA) megmenekítette a recipienst a halálos kórfolyamattól. Végül pedig nem is a besugárzás, illetve a csontvelő eliminálása miatt ment végbe, hiszen, amikor az állatokat szingenikus lép-és csontvelői sejtekkel transzplantáltuk (Act-mOVA → Act-mOVA) a transzplantációt követő 14. napra az állatok visszanyerték eredeti súlyukat és felépültek a sugárbetegségből. A transzgén miHA-mismatch modell a konvencionális MHC-mismatch BALB/c → C57BL/6 modellhez, illetve az irodalomban leírt hasonló modellekhez hasonló dinamikájú (166), azonban mind azoknál, mind a K14-OVA/OT-I aGvHD modellnél gyorsabb lefolyású letalitást váltott ki (129). Mindez feltehetően a nagyobb számú reaktív CD8⁺ T-sejtnek, illetve a cél-antigén ubikviter kifejeződésének köszönhető, és egyértelműen aláhúzza modellünk robosztusságát. Hasonlóan a humán klinikai aGvHD-hez, és ellentétben a K14-OVA aGvHD modellel, a reakció függött az

alkalmazott TBI kondicionálástól, mivel a besugárzáson át nem esett Act-mOVA állatok, OT-I graftot követően, nem mutattak semmilyen súlycsökkenést, és nem mutatták az aGvHD tüneteit (nem ábrázoltuk). Az irodalomban ismert ez a jelenség, például P→F1 modellnél kimutatták, hogy TBI kondicionálás nélkül inkább egy immunhiányos állapot, mint aGvHD alakult ki (121).



17. Ábra: *CD8+ OT-I→Act-mOVA modell okozta aGvHD-szerű tünetek követése, letális TBI-t követően.*

A) Az állatok testszúly-vesztésének követése.

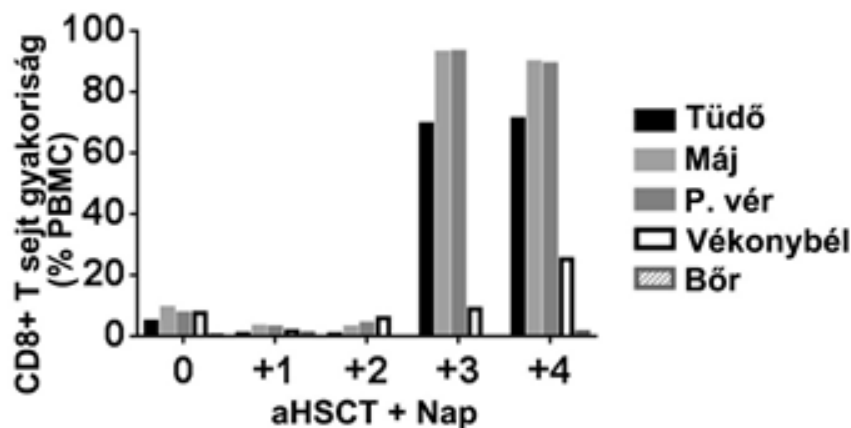
B) Az állatok túlélésének követése. CD8+ T-sejteket tartalmazó, CD8+ T-sejtektől depletált, szingén graftot kapó, és MHC mismatch-elt allograftot kapó recipiensekben

5.1.1.2 Az aGvHD-szerű tünetek a graft CD8+ T-sejteknek a célszervekben való feldúsulásával egyidejűleg jelentkeznek.

Tekintve, hogy a CD8+ T-sejtek klonális expanziója és bevándorlása a célszövetekbe szükséges az aGvHD-ra jellemző citotoxikus szövetkárosodás indukálásához, kíváncsiak voltunk a célszervek (tüdő, bőr, bél, máj) és a perifériális vér CD8+ T-sejt számának alakulására is a transzplantációt követően. A kísérletekhez a CD8+ OT-I→Act-mOVA

modellt használtuk, és a transzplantációt követő 4. napig követtük a CD8⁺ T-sejt szám változást, amit a célszervek szöveti dezintegrációját követően áramlási citometriával analizáltunk (**18. Ábra**). Azt tapasztaltuk, hogy az aGvHD-szerű tünetek kialakulásával párhuzamosan a CD8⁺ T-sejt szám nem csak a legtöbb célszervben (tüdő, máj, bél), de a perifériális vérben is megemelkedett. A legtöbb szövet esetében ez a CD8⁺ T-sejt feldúsulás platója a transzplantációt követő 3.-4. napon, azaz a medián túlélés előtti utolsó napokon alakult ki. Érdekes módon, azonban, ellentétben a K14-OVA modellel, a CD8⁺ OT-I→Act-mOVA modellben nem csak a bőr szőrvesztésének elmaradását figyeltük meg, ami a kután GvHD egyik tünete egérben, hanem a bőrben a CD8⁺ T-sejtek számának emelkedése sem volt tapasztalható (**19. Ábra**).

18. Ábra: CD8⁺ OT-I → Act-mOVA modellben, letális aGvHD-szerű tünetek



kialakulásának CD8⁺ T-sejt függése. A CD8⁺ T-sejt szám változásának követése az aGvHD által érintett célszövetekben.

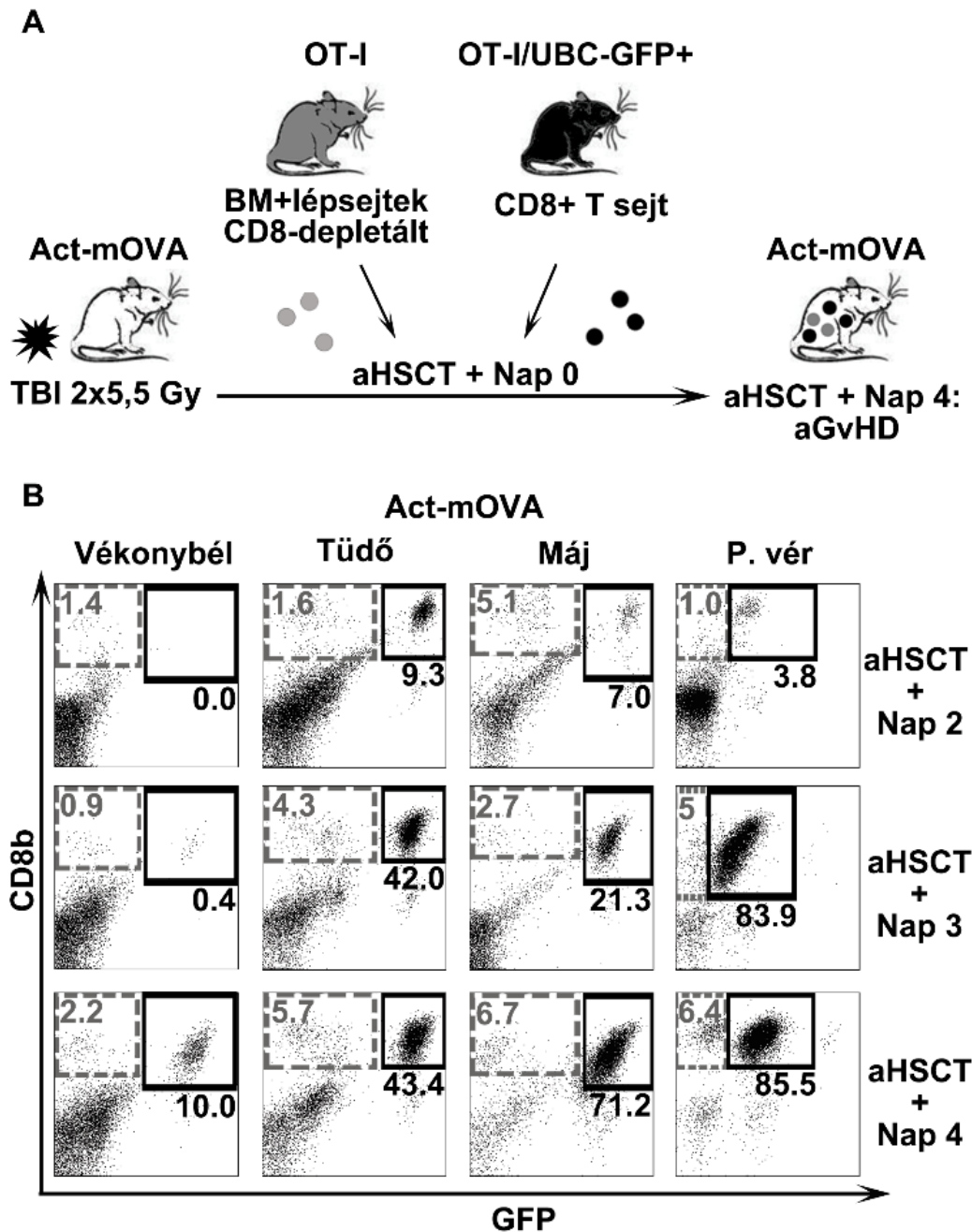
5.1.1.3 Sejtkövetés; A CD8⁺ T-sejt akkumuláció a célszervekben a donor T-sejt aktivitás következménye

Az előzőekben már bizonyításra került, hogy az Act-mOVA/OT-I modellben az aGvHD-szerű tünetek kialakulásához szükséges CD8⁺ T-sejtek felhalmozódása a különböző célszervekben valóban megtörténik, ám az még nem került tisztázásra, hogy ezek a sejtek a graft valóban donor eredetű, miHA-specifikus CD8⁺ T-sejtjei, vagy esetleg a recipiens TBI-t túlélte, a citokin vihar hatására bystander-aktivált CD8⁺ T-sejtjeiről van szó. Ennek tisztázására Act-mOVA recipiens állatokat transzplantáltunk OT-I állatból származó grafttal, azonban a graftot előzetesen CD8⁺ T-sejt depletáltuk, majd OT-I/GFP, kettős transzgén állatokból származó CD8⁺ T-sejtekkel egészítettük ki (CD8⁺ OT-I/UBC-GFP→Act-mOVA modell). A rendszerben a GFP jelölés alapján könnyen el tudtuk

különíteni a GFP+ donor-eredetű és a GFP- bystander aktivált recipiens eredetű CD8+ T-sejteket egymástól (**19A Ábra**). A követést a transzplantáció utáni 4. napig végeztük. A vizsgálat során azt találtuk (**19B Ábra**), hogy bár az érintett szervekben a TBI-t követő első napokban még jelentős számban voltak jelen a recipiensre jellemző bystander sejtek (GFP-, szürke szín), a CD8+ T-sejtek feldúsulása egyértelműen a graftból származó miHA-specifikus CD8+ T-sejteknek volt tulajdonítható (GFP+, fekete szín).

5.1.1.4 Hisztológia: A CD8+ OT-I→Act-mOVA modell érintett szerveiben az aGvHD patológiájának minden aspektusa megfigyelhető

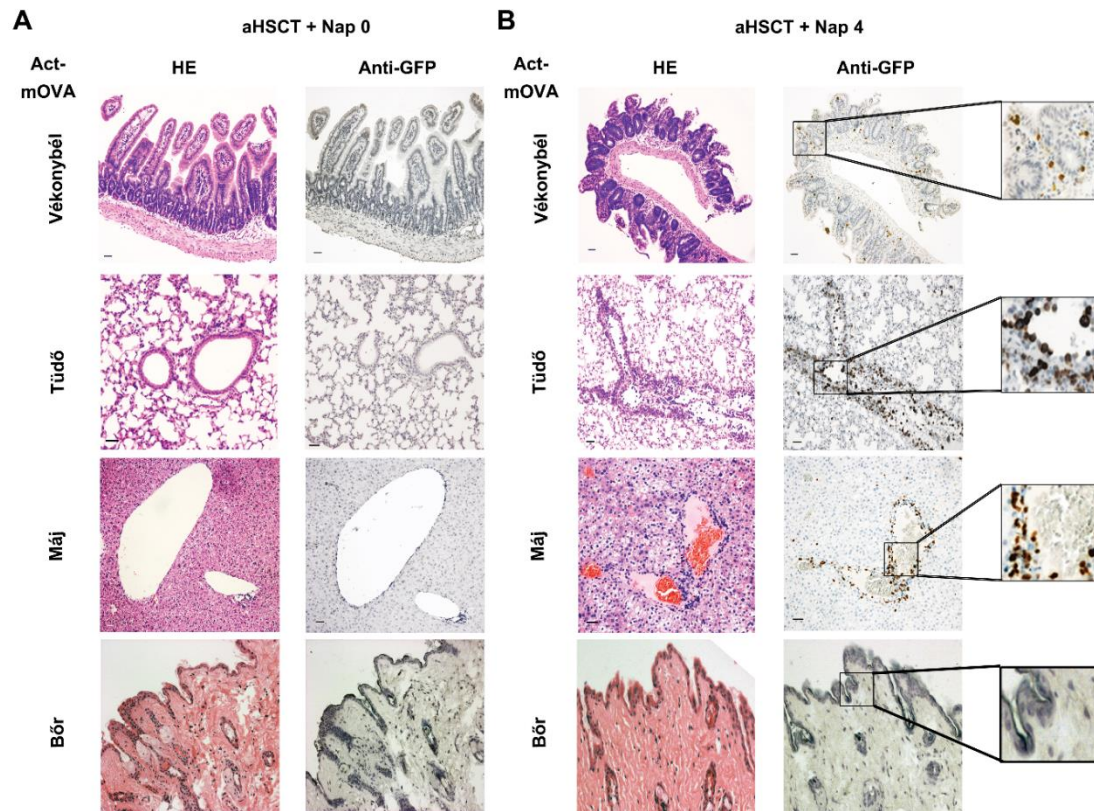
Ezután kíváncsiak voltunk arra, hogy az aGvHD-szerű tüneteket mutató modellünk valóban képes-e reprodukálni az aGvHD-ra jellemző, a célszövetekben megjelenő szövetkárosodást, és a tipikus hisztopatológiai kritériumait is. A vizsgálatokhoz OT-I/UBC-GFP→Act-mOVA modellt használtunk, majd a recipiens célszerveiből metszeteket készítettünk, amit, HE festésnek és anti-GFP IHC-nak vetettünk alá. Így párhuzamosan vizsgálhatóvá vált a szervi károsodás, és a donor eredetű, miHA-specifikus CD8+ T-sejtek célszervekben történő mozgása és eloszlása. Mivel azt tapasztaltuk, hogy a CD8+ T-sejt beáramlási plató a különböző célszervekbe a transzplantációt követő 4. napon következik be, ezért a hisztológia esetében is a 0. nap (**20A Ábra**) mellett a transzplantációt követő 4. napot (**20B Ábra**) választottuk a vizsgálatok elvégzésére. A hisztológia igazolta, hogy a 0. naphoz képest a 4. napon a vékonybélben kiterjedt szervi károsodás és súlyos boholy atrófia áll fenn, a máj esetében epevezeték károsodás, endotheliitis és a portális traktusban nagy mennyiségű limfocita beáramlása látható, míg a tüdő esetén súlyos alveolitis és bronchitis figyelhető meg (**20. Ábra**). A szöveti elváltozások mellett jól látható a donor eredetű GFP+/CD8+ T-sejtek masszív infiltrációja is a célszervekben (anti-GFP IHC, **20. Ábra**). A célszervek közül megint csak a bőr volt az egyetlen szövet, ahol leszámítva egy kismértékű endotheliitis megjelenését, nem történt számottevő változás, nem volt jelentős patológiai elváltozás a 0. naphoz képest. Nem alakultak ki szubepidermális hólyagok, nem láttuk a keratinociták eger GvHD-ban tipikus apoptózisát a szőrtüszőkben, illetve a CD8+ T-sejt infiltráció is szinte teljesen elmaradt a dermiszben.



19. Ábra: A donor eredetű CD8+ T-sejtek követése CD8+ OT-I/UBC-GFP→Act-mOVA modellben.

A) CD8+ OT-I/UBC-GFP→Act-mOVA modell sémája. A graft eredetű CD8+ T-sejtek GFP jelöltek, így könnyen követhetőek a GFP- Act-mOVA recipiensben.

B) A graft eredetű CD8+ T-sejtek (fekete keret, GFP+) és a recipiens bystander CD8+ T-sejtjeinek (szürke keret, GFP-) elkülönítése és relatív gyakorisága az aGvHD tipikus célszerveiben az aHSCT-t követő 2. 3. és 4. napon.



20. Ábra: A graft UBC-GFP / OT-I CD8 + T-sejt-eloszlás és betegség patológiájának egyidejű elemzése az aGvHD által érintett célszervekben. Reprezentatív ábrák az aHSCT napján, 0. nap

(A) és a transzplantációt követő medián túlélés napján, vagyis a 4. napon (B) a bekövetkezett változásokról, HE- és GFP IHC segítségével.

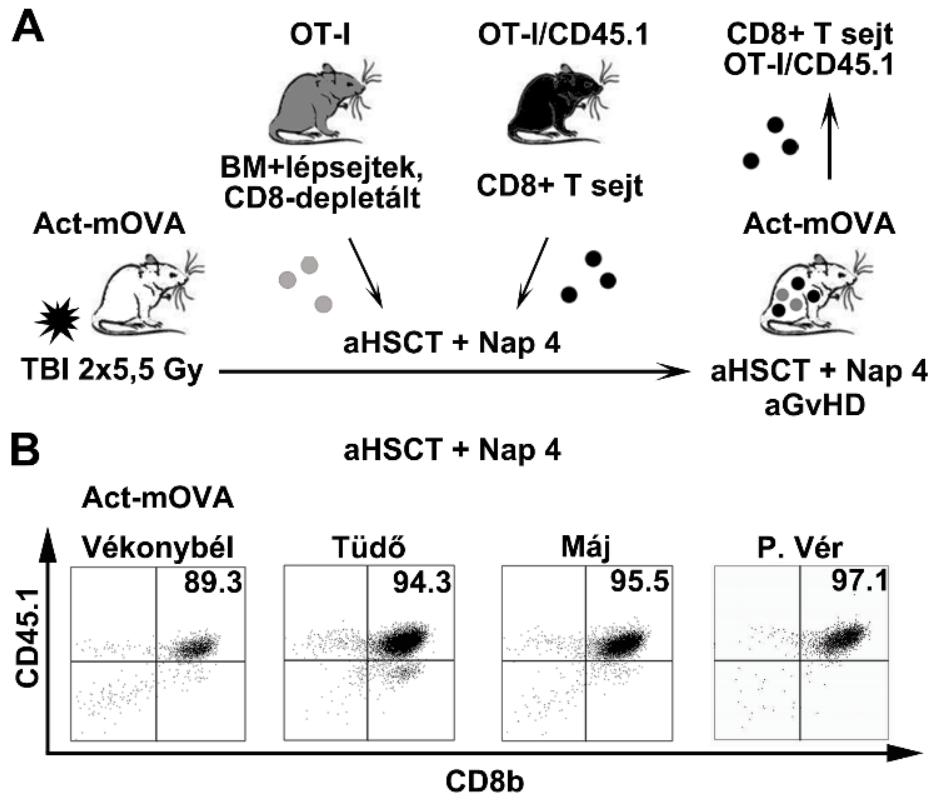
A jobb láthatóság érdekében fekete négyzetekkel jelöltük a nagyított területeket, melyben a barna foltok jelzik a GFP+/OT-I CD8+ T-sejteket (IHC). A skála minden kép bal sarkában látható, 50µm nagyságú.

Ezek az eredmények összességében azt mutatják, hogy a kísérleti állatoknál kialakult az aGvHD gasztrointesztinális és hepatikus formája, valamint a humán aGvHD-hoz társuló pulmonalis bronchitishez hasonló tünetek a tüdőben; azonban a klasszikus bőr aGvHD kialakulása teljes mértékben elmaradt.

5.1.2 Act-mOVA/OT-I modell felhasználása az aGvHD célszerveibe vándorló CD8+ T-sejtek összehasonlító vizsgálatára

5.1.2.1 A CD8+ CD45.1 OT-I→Act-mOVA modell alkalmas a donor–eredetű, miHA-specifikus CD8+ T-sejtek intakt és nagy tisztaságú visszanyerésére az aGvHD-s célszervekből.

A CD8+ T-sejtek intakt kinyerésére a modell egy változatát, a CD8+ CD45.1/OT-I→Act-mOVA modellt használtuk (**21A Ábra**), mely lehetővé teszi a CD8+ T-sejtek, kinyerését a CD45.1 markerük alapján, automatizált mágneses szeparálás segítségével. Ugyanakkor aktivitásukat vagy szervezetben belüli mozgásukat nem korlátozza, és a donor CD45.1 illetve a recipiens CD45.2 közti csekély különbség miatt a recipiens TBI-t túlélő immunrendszeri sejtjei számára sem látható, vagy jelent immunogén, leküzdendő célt. A modellben az Act-mOVA recipiens amely CD45.2 háttérű, olyan graftot kap, amely lépsejtjei CD8+ T-sejt depletáltak és CD45.2/OT-I egérből, míg a CD8+ T-sejtjei pedig CD45.1/OT-I állatból származnak. Az egerekből származó szervek automatizált disszociálása, majd a belőlük kinyert T-sejtek automatizált mágneses szeparálása jelentős számú és nagy tisztaságú CD8+ T-sejt kinyerését tette lehetővé a transzplantációt követő 4. napon (**21B Ábra**). Az aGvHD által érintett célszervekből kinyert T-sejtek kitermelését és tisztaságát flow citometria segítségével monitoroztuk.



21. Ábra: A CD8+ CD45.1 OT-I→Act-mOVA modell vizsgálata a donor eredetű CD8+ T-sejtek intakt formában, nagy tisztaságban való visszanyerésére

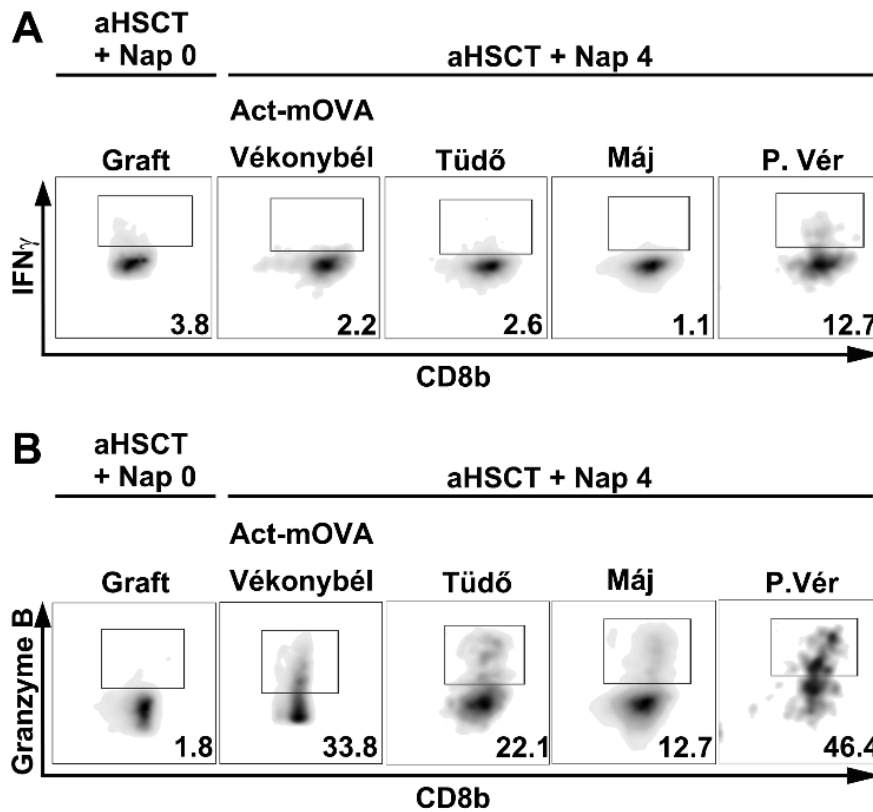
A) A CD8+ CD45.1 OT-I→Act-mOVA modell sematikus ábrája

B) Donor-eredetű CD8+/CD45.1+ T-sejtek visszanyerése az aGvHD által érintett célszervekből automatizált szöveti disszociációval, mágneses szeparálással, majd a kitermelés és a tisztaság ellenőrzése flow citometriával, az aHSCT-t követő 4. napon.

5.1.2.2 Az aGvHD által érintett célszervekből származó CD8+ T-sejtek klonális expanzió átesett, teljes értékű effektor sejtek

Ezt követően tesztelni kívántuk, hogy a CD45.1 CD8+ T-sejtek, amiket a különböző aGvHD által érintett szervekből visszanyertünk, milyen fenotípusos sajátosságokkal bírnak. Ezzel tisztázni kívántuk, hogy vajon ez a CD8+ T-sejt feldúsulás az aktiválódott effektor T-sejtek aktív homingja miatt alakult ki, vagy inkább az aktiválatlan graft eredetű CD8+ T-sejtek toborzása történik a gyulladt szövetekben. Ennek megválaszolására a vékonybélből, tüdőből, májból és a perifériás vérből izolált CD45.1/OT-I CD8+ T-sejteken immunfenotipizálást végeztünk flow citometria segítségével (**22. Ábra**). Azt találtuk, hogy a CD45.1/OT-I CD8+ T-sejtek, amelyek az aGvHD-val érintett

szövetekből vagy perifériás vérből származtak, erőteljesen megnövekedett granzim B termelést folytattak, ami a citotoxikus ölő aktivitás egyik markere (**22A Ábra**). Ezzel szemben az IFN γ termelést vizsgálva azt láttuk, hogy míg a vérből származó CD45.1/OT-I CD8 $^{+}$ T-sejtek valamelyest megemelkedett mennyiségű IFN γ -t termeltek, addig a célszervekből származók nem (**22B Ábra**).



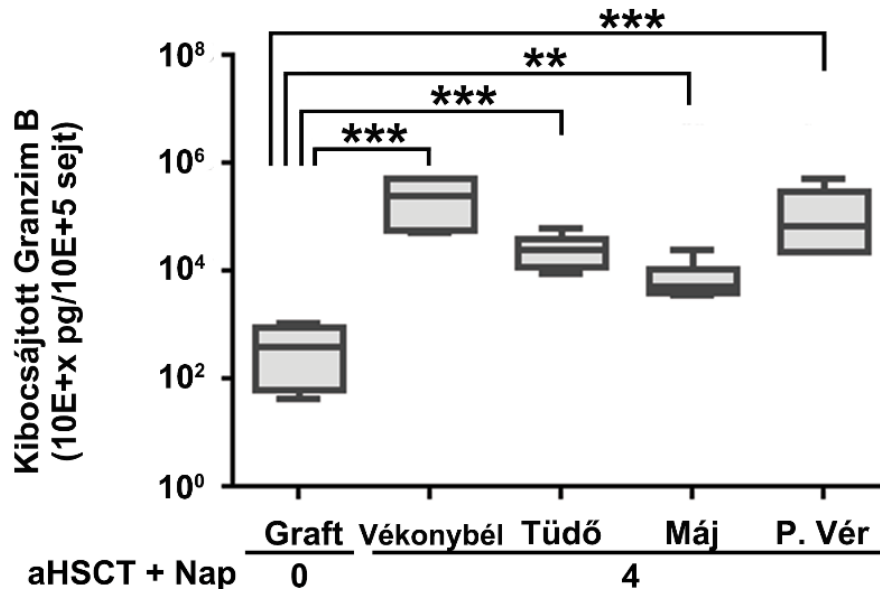
22. Ábra: A bevitt graftból (kontroll) és az aGvHD által érintett célszervekből származó CD8 $^{+}$ T-sejtek effektor fenotípusának vizsgálata az aHSCt 0. illetve 4. napján

A) Az IFN γ termelés követése flow citometriával

B) A granzim B termelés követése flow citometriával.

Ezután kíváncsiak voltunk arra, hogy ez a granzim B termelés csak fehérje-szintézis, vagy tényleg aktív citotoxikus granzim szekréciót is jelent. A kérdés eldöntésére ELISA tesztet végeztünk és a 0. napi graftból származó CD45.1/OT-I CD8 $^{+}$ T-sejtek granzim B termelését összevetettük a transzplantációt követő 4. napi, különböző az aGvHD által érintett célszervekből származó CD45.1/OT-I CD8 $^{+}$ T-sejtek termelésével (**23. Ábra**).

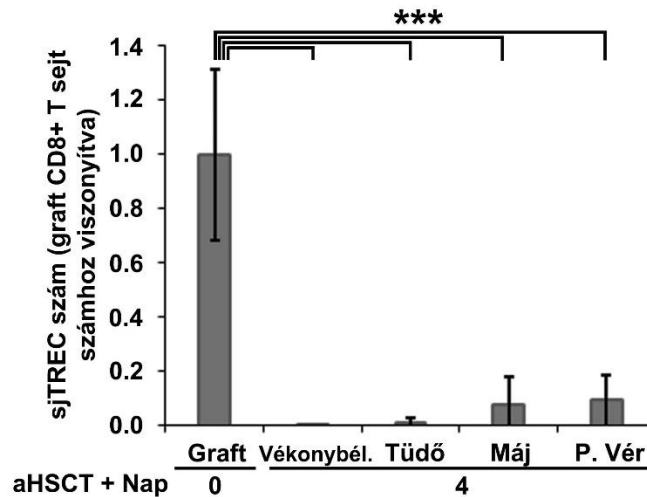
Azt találtuk, hogy egy igen erőteljes, célszervtől függően 10-1000 szerez emelkedés van a graft miHA-specifikus CD8⁺ T-sejtjei által folytatott granzim B szekréciójában a 0. és a 4. nap között, ami egyértelmű citotoxikus aktivitásra utal az érintett célszervekben.



23. Ábra: A granzim B-felszabadulás vizsgálata CD8⁺ CD45.1 OT-I→Act-mOVA modellben.

Granzim B felszabadulás követése ELISA-val az aHSCt 0. napján és az aHSCt-t követő 4. napon az aGvHD által érintett célszervekből.

Ezután egy Q-PCR alapú TREC assayt végeztünk annak eldöntésére, hogy ezek a CD45.1/OT-I CD8⁺ T-sejtek valóban átestek-e klonális expanszió, azaz valóban teljes értékű, aktivált effektor sejtekről van-e szó (**24 Ábra**). Az elemzést követően azt találtuk, hogy a 0. napi graft mintához képest óriási visszaesés látható a TREC számban, ami azt bizonyítja, hogy ezek a 4. napon kinyert, eredetileg túlnyomórészt naiv graft eredetű CD45.1/OT-I CD8⁺ T-sejtek átestek klonális expanszió, elvesztették naiv fenotípusukat és az összes aGvHD által érintett célszervben mint expandált, effektor típusú, citotoxikus aktivitásra képes sejtek vannak jelen.



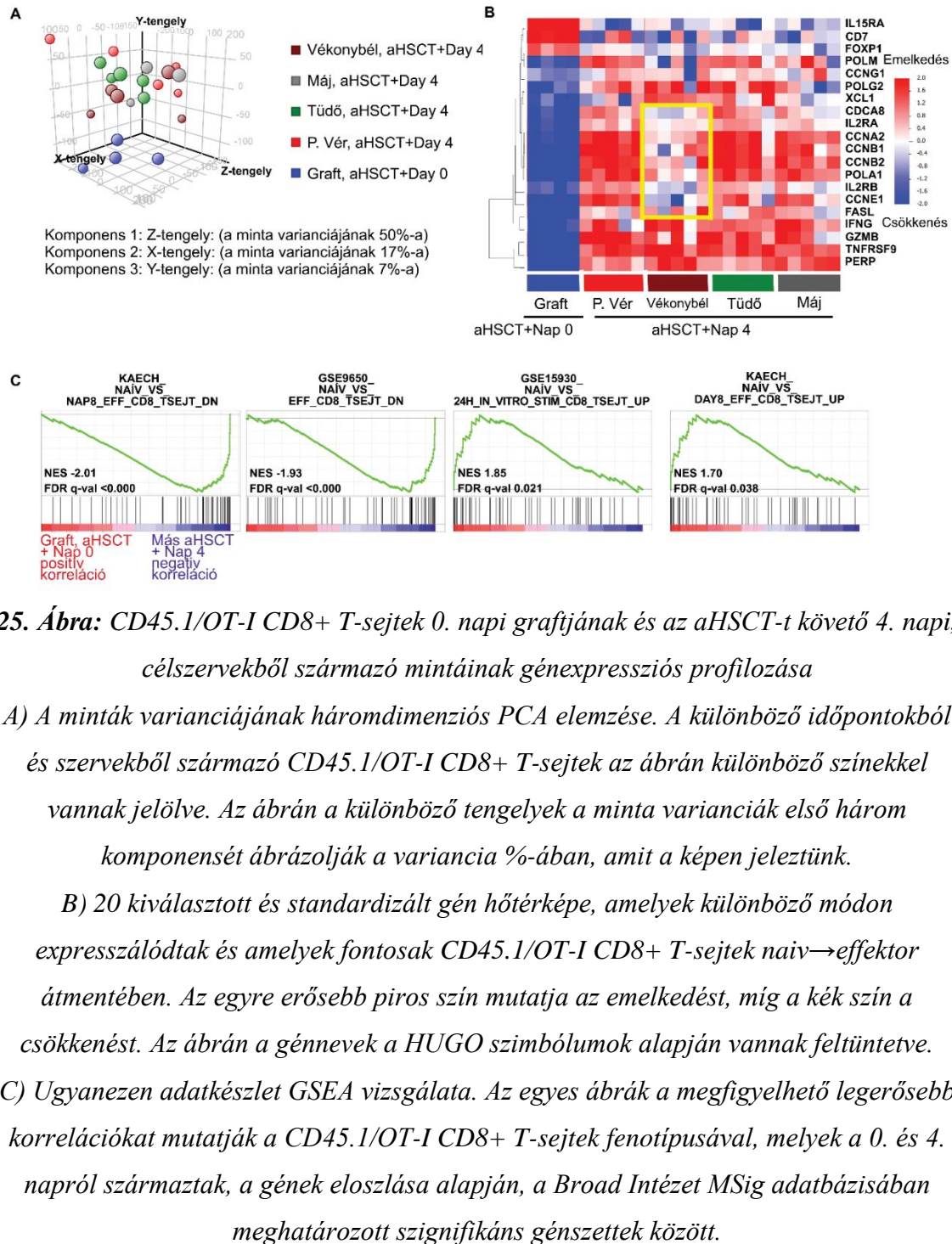
24. Ábra: A naiv eredetű TREC fokozatos csökkenése CD8+ CD45.1 OT-I→Act-mOVA modellben

A TREC szám követése Q-PCR segítségével az aHSCT 0. napján és az aHSCT-t követő 4. napon az aGvHD által érintett célszervekből. A csillagok a szignifikáns különbséget jelzik.

5.1.2.3 Transzkriptom analízis: A transzplantált CD8 + T-sejtek transzkriptom profilja megerősíti a naiv/effektor átmenetet, ugyanakkor kevés különbséget tár fel az aGvHD különböző célszerveibe infiltráló CD8 + Teff-sejtek között

A transzkriptom analízis elsőként azt tárta fel, hogy a CD8+ CD45.1 OT-I→Act-mOVA modellben, a graftból származó CD45.1/OT-I CD8+ T-sejtek jelentős fenotípus változáson mentek keresztül az aHSCT-t követő 4. napig az Act-mOVA recipiensben. A Principal Component Analysis (PCA) kimutatta, hogy az aGvHD által érintett célszervekből, az aHSCT-t követő 4. napon kinyert CD45.1/OT-I CD8+ T-sejtek egymáshoz közel rendeződtek, függetlenül attól, hogy melyik szervből származtak (**25A Ábra**) piros, zöld, szürke és barna pontok). Az összes mintára vonatkozó variancia 60%-át a 0. napi és 4. napi sejtcsoportok között kialakuló különbségek adják (**25A Ábra** Z és X tengelyek). A különbségeket tovább elemeztük egyutas ANOVA és Benjamini-Hochberg korrekció (FDR <0.05) segítségével, majd Tukey's post hoc teszttel (p <0,05). Összevetve a 0. napi graftból, illetve a 4. napi célszervekből származó CD45.1/OT-I CD8+ T-sejteket, összesen 2514 különböző módon expresszálandó gént találtunk. A leszabályozódó gének között volt számos olyan, melyek a naiv sejtekre jellemzőek (**25B Ábra** hő térkép teteje, például FOXP1), olyanok, amelyek a naiv→effektor átmenet során tűntek el (például CD7), illetve, amelyek inkább a memória sejtek stabilitásáért felelősek,

mint az effektor sejtek jellemzői (IL15RA). Mindamelletts számos az effektor sejtekre jellemző gén felszabályozódása is látható (**25B Ábra** alja). Ilyenek például a különböző effektor molekulák (IFN γ , GZMB, FASL), ciklinek (CCNA1, CCNB1, CCNB2, CCNE1, CCNG2) DNS polimeráz alegységek, melyek a klonális expanzióhoz szükségesek (POLA1, POLG2, POLM), gének, amelyek az effektor T-sejtek túléléséhez fontosak (IL2RA, IL2RB) és a rövid életidejű effektor CD8⁺ T-sejtekre jellemző markerek (PERP, **25B Ábra**). Végül a Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) elemzés megerősítette, hogy a különbségeket az okozta, hogy a graftból származó CD8⁺ T-sejtek az aHSCT-t követő 4. napra effektor fenotípusúvá váltak (**25C Ábra**). A vizsgálat azt is kimutatta, hogy a szignifikáns expressziós különbséget mutató gének mindig a Broad Institute's MSig adatbázis géncsoportjainak legmagasabb és legalacsonyabb részeiben dúsultak fel a változás iránya és nagysága szerint rendezve őket, egyértelműen megkülönböztetve a naiv és effektor T-sejteket egymástól.



A modell elég érzékeny volt ahhoz, hogy a szövetspecifikus CD8+ T-sejtek funkcionális jellemzői is detektálhatók legyenek az aGvHD kialakulása során. Például a vékonybélbe vándorló miHA-specifikus graft CD8+ T-sejtek esetében olyan gének (IL2R alegységek és ciklinek), amelyek a gyors klonális expanszióhoz és az azt követő T-sejt aktivációhoz

szükségesek, kevésbé intenzíven íródnak át, mint az aGvHD bármely más célszervében (**25B Ábra**, sárga keret). Azonban a használt elemszám mellett a különböző szövetekben elhelyezkedő CD8⁺ T-sejtek fenotípusában megjelenő különbségek nem érték el a statisztikai szignifikancia szintet. Valóban, számos tanulmány számol be arról, hogy fenotípusbeli eltérések vannak a különböző aGvHD által érintett célszervekbe vándorló T-sejtek között (154, 167), illetve ezek a szövetspecifikus különbségek képesek befolyásolni a CD8⁺ memóriát is (168).

Ezzel együtt azonban világossá vált, hogy várakozásainkkal ellentétben az OT-I→Act-mOVA aGvHD modell, a modellkíséreleteink elsődleges céljára, azaz a bőrbe és a vékonybélbe vándorló CD8⁺ T-sejteknek az összehasonlító vizsgálatára alkalmatlannak bizonyult. A jellegzetes bőrtünetek elmaradása, a kután T-sejtes infiltráció hiánya és a bőr jellegzetes apoptotikus érintettségének távolléte egyértelműen arra utaltak, hogy a modell bár a humán aGvHD célszerveinek nagy részét lefedi, azonban a bőr aGvHD kiváltására, és ezáltal bőr és bél CD8⁺ T-sejtek összehasonlítására alkalmatlan. Ez a cél antigén, vagyis az ovalbuminnak a széles körű, minden szervre kiterjedő expressziójára tekintettel igen meglepő eredmény volt, aminek feltehető okait a Diskusszióban elemezzük. Figyelmünk a továbbiakban a humán aGvHD hasonló célú vizsgálata felé fordult.

5.2 A CD8⁺ T-sejtek bél és bőr specifikus homing biomarkereinek azonosítása humán aGvHD-ban

A CD8⁺ T-sejtek homingjával kapcsolatban 3 fő kérdésre kerestük a választ, hipotézismentes, nagy áteresztőképességű teljes genomi vizsgálattal:

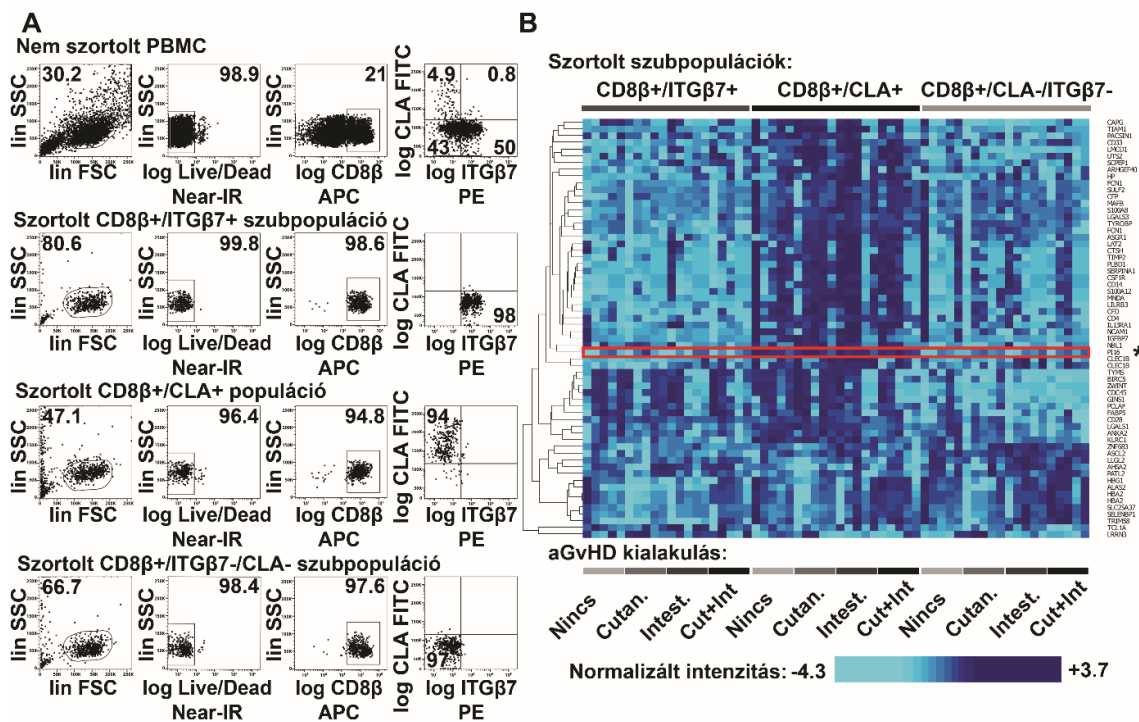
1. Alapkutatási kérdésként kerestünk olyan markereket, melyek aGvHD-független módon csak a bélrendszerbe (ITGB7⁺) vagy csak a bőrbe (CLA⁺) vagy egyik szövetbe sem (CLA⁻/ITGB7⁻) vándorló CD8⁺ T-sejteken jelennek meg.
2. Célul tűztük ki olyan markerek felkutatását, amelyek az aGvHD egyik szervi érintettsége során jellemzőek.
3. Illetve olyan markerek feltárását céloztuk, melyek valamely szövetbe vándorló CD8⁺ T-sejt populációra és valamely szervi érintettséget mutató aGvHD-ra is egy időben jellemzők, aminek prognosztikai jelentősége van abban, hogy az aGvHD, illetve annak súlyossága vagy szervspecifikussága megjósolható-e.

Jelen dolgozatban egyetlen marker, a PI16 alapkutatási szempontból fontos marker validálása kerül bemutatásra.

5.2.1 Microarray szűrővizsgálat, elsődleges eredmények és validálásuk

5.2.1.1 *A bőr irányú homingra programozott CD8⁺ T-sejtek a PI16 mRNS-t fejezik ki humán aGvHD-ban*

A bőrbe és a vékonybélbe irányuló homingra programozott aktivált humán CD8⁺ T-sejtek összehasonlító vizsgálatához a Módszerek szakaszban leírt módon, gyűjtöttünk PBMC betegmintákat aHSCT-n átesett 40 páciensből, összesen 4 csoportban, azaz az aGvHD-tól nem érintett (n=10), csak után aGvHD-ban érintett (n=10), csak gasztrointesztinális aGvHD-ban érintett (n=10), és mind után, mind gasztrointesztinális aGvHD-ban érintett betegektől (n=10). A minták begyűjtésére az aGvHD kialakulásának időpontjában, illetve a nem érintett csoportban az aGvHD kialakulásának egyébként tipikus időszakában került sor. A betegek adatai a GEO adatokkal együtt feltöltve találhatóak. A mintákból származó PBMC-eket ezt követően háromutas FACS szortolásnak vetettük alá, valamennyi csoport, valamennyi betegből elkülönítve három T-sejt csoportot. Ezek a csoportok a bőr homingot mutató (Ly/LIVE/DEAD®-/CD8β+/CLA+), a bél homingot mutató (Ly/LIVE/DEAD®-/CD8β+/ITGβ7+), illetve egyik előző szövetbe sem vándorló (Ly/LIVE/DEAD®-/CD8β+/CLA-/ITGβ7-), referenciaként használt CD8⁺ T-sejt csoportok voltak. A szortolás közben alkalmazott kapuzási stratégia és a populációk tisztasága a **26A Ábrán** látható. Ezt követően a különböző CD8⁺ T-sejtpopulációkból RNS-t izoláltunk, majd kétkörös RNS amplifikáció segítségével tovább erősítettük a jelet. Először ellenőriztük a felamplifikált minták intaktságát és tisztaságát, majd a mintákat összehasonlító génexpressziós vizsgálatnak vetettük alá. A transzkripció elemzését követően a három CD8⁺ T-sejt szubpopulációt összevetve egymással, összesen 62 eltérően expresszálódó gént azonosítottunk. Az eltérő expressziót mutató gének hőterképe a **26B Ábrán** látható (**26B Ábra** Kétutas RM ANOVA, FDR <0.01), míg az analízis részletes eredményei a **9. Táblázatban** olvashatók). Mivel a GSEA és egyéb hálózat- és útvonal-elemzési próbálkozások nem voltak sikeresek, a továbbiakban a géneket egyesével elemeztük. A legjelentősebb különbségeket mutató gének közül további validálásra, az irodalmi adatokat is figyelembe véve a peptidáz inhibitor 16-ot (PI16) választottuk ki. (A **26B Ábrán** csillaggal és piros négyzettel jelölt.)



26. Ábra: Különböző szervekbe vándorló CD8+ T-sejtek (bőrbe vándorló, bélbe vándorló és referencia T-sejtek) háromutas FACS szortolása és összehasonlító gén expressziós profilozása négy különböző aHSCT betegcsoportban (Nincs aGvHD, kután aGvHD, gasztrointesztinális aGvHD, mindkét fajta aGvHD manifesztáció egyidejűleg).

A) A különböző célszervekbe vándorló CD8⁺ T-sejtek FACS szortolási stratégiája és a kinyert frakciók tisztasága. Fent: egy nem szortolt minta Lent: szortolt frakciók: Ly/Live/CD8β/ITGβ7+₋ bélbe vándorló, Ly/Live/CD8β/CLA+₋ bőrbe vándorló és Ly/Live/CD8β/ITG β7-/CLA-₋referencia. A számok a kapun belüli százalékokat mutatják.

B) A különböző betegtípusokból FACS szortolt, a célszervekbe vándorló CD8+ T-sejtek génexpressziós profiljának hőtérképe. A hőtérkép tetején a három összehasonlított CD8+ T-sejt homing csoport, alul pedig a különböző betegcsoportok láthatóak. A hőtérképen az oszlopok az egyedi betegmintákat reprezentálják, míg a sorok az egyes géneknek felelnek meg. A halványkék szín az alacsony, míg a sötétkék szín a magas expressziót mutatja az átlaghoz képest. A hőtérkép a kétutas RM ANOVA (FDR <0.01) segítségével azonosított, összesen 62, különböző módon expresszálandó gént mutatja be.

Az ábrázolt adatok SD normalizáltak. Az ábrán összesen 20 beteg, 4 betegtípusba tartozó mintájának 3 felé szortolt frakciói, vagyis összesen 60 minta látható. Csillag és piros keret jelöli a PII6-ot.

9. Táblázat: Bőrbe és bélbe irányuló homingot végző CD8⁺ T-sejt szubpopulációk által különböző módon expresszált gének listája. A táblázat a legszignifikánsabb gének ANOVA FDR értékeit, az egyes T-sejt homing szubpopulációkban való kifejeződésének log2 transzformált geometrikus átlagát és a T-sejt homing szubpopulációk páronkénti összehasonlításának szignifikancia értékeit mutatja be.

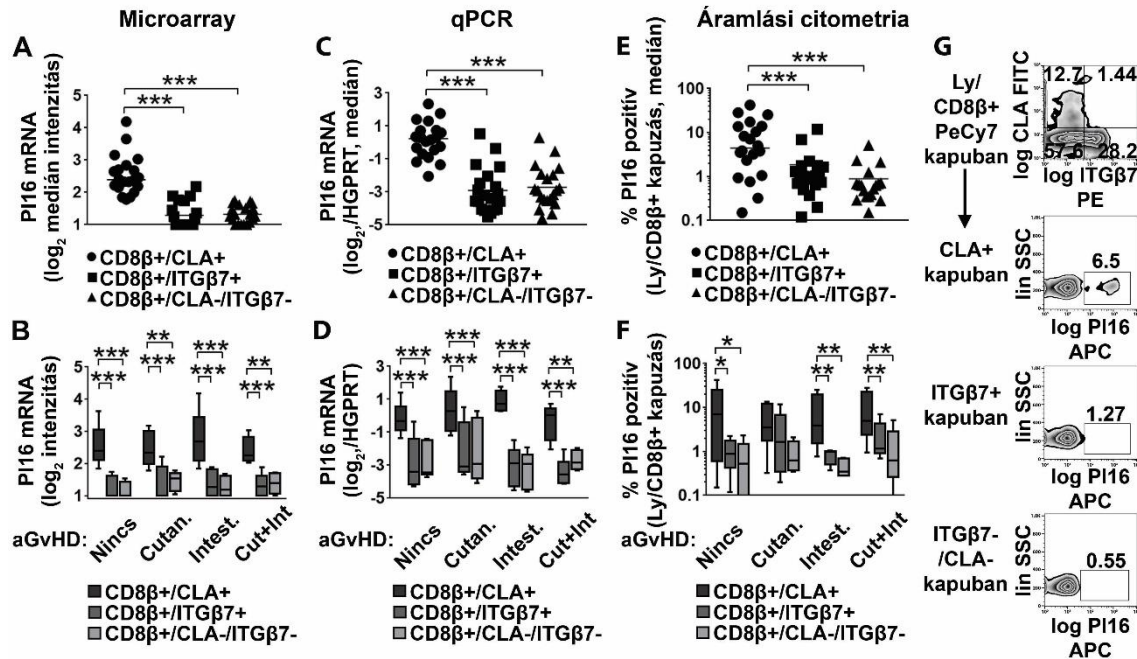
Különböző módon expresszáldott gének listája, T sejt szubpopuláció és beteg típus szerint					
Név	ANOVA FDR-ei	Geometrikus átlag CLA+	Geometrikus átlag ITGB7+	Geometrikus átlag CLA-/ITGB7-	Páronkénti összehasonlítás
peptidase inhibitor 16	<0.0001	5.83	2.51	2.51	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
tripartite motif containing 58	<0.0001	4.37	2.56	4.66	CLA+ vs. ITGB7+ B7+ vs. CLA-/ITGB7-
ricolin 1	<0.0001	6.16	3.48	4.31	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
ricolin 1	<0.0001	7.53	3.36	4.67	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
S100 calcium binding protein A8	<0.0001	10.72	5.36	6.84	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
TYRO protein tyrosine kinase binding protein	<0.0001	6.84	3.12	4.71	CLA+ vs. ITGB7+ B7+ vs. CLA-/ITGB7- CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
CD14 molecule	<0.0001	4.84	2.42	2.87	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
leukocyte immunoglobulin like receptor B3	<0.0001	3.8	2.07	2.5	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
serpin family A member 1	0.0001	4.36	2.11	2.64	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
CD28 molecule	0.0001	5.13	5.38	3.56	B7+ vs. CLA-/ITGB7- CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
scheete-scute family bHLH transcription factor 2	0.0001	4.01	3.05	5.28	B7+ vs. CLA-/ITGB7- CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
neural cell adhesion molecule 1	0.0001	4.87	2.21	2.9	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
S100 calcium binding protein A12	0.0002	4.67	2.3	2.87	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
phospholipase B domain containing 1	0.0002	4.21	2.1	2.46	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
PCNA clamp associated factor	0.0003	6.78	6.47	3.67	B7+ vs. CLA-/ITGB7- CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
C-type lectin domain family 1 member B	0.0003	4.24	2.51	3.17	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	0.0003	3.43	2.08	2.07	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
myeloid cell nuclear differentiation antigen	0.0006	3.7	2.05	2.29	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
TIMP metalloproteinase inhibitor 2	0.0006	4.01	2.23	2.63	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
colony stimulating factor 1 receptor	0.0007	4.12	2.12	2.86	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
baculoviral IAP repeat containing 5	0.0007	4.85	4.42	2.5	B7+ vs. CLA-/ITGB7- CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
killer cell lectin like receptor C1	0.0007	5.74	3.39	3.96	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
CD14 molecule	0.0007	4.28	2.2	2.76	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
PAT1 homolog 2	0.0007	3.23	3.99	4.62	CLA+ vs. CLA-/ITGB7- CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
Rho guanine nucleotide exchange factor 40	0.001	3.41	2.13	2.42	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
cathespin H	0.0011	3.9	2.44	2.63	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
heptoglobin	0.0013	3.45	2.24	2.43	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	0.0014	4.06	3.11	2.52	CLA+ vs. CLA-/ITGB7- CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
thymidylate synthase	0.0014	4.73	4.3	2.36	B7+ vs. CLA-/ITGB7- CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
insulin like growth factor binding protein 7	0.0015	3.66	2.13	2.29	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
zinc finger protein 883	0.0015	6.82	5.93	8.27	B7+ vs. CLA-/ITGB7- CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
complement factor properdin	0.0016	5.79	3.76	4.45	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
T-cell leukemia/lymphoma 1A	0.0016	3.44	4.95	3.06	B7+ vs. CLA-/ITGB7- CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
complement factor D	0.0017	3.57	2.14	2.79	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
galectin 1	0.0018	7.97	5.55	5.47	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
UIM and cysteine rich domains 1	0.0018	3.23	2.35	2.07	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
neuroblastoma 1, DAN family BMP antagonist	0.0019	2.79	2.12	2.1	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
serine carboxypeptidase 1	0.0021	4.2	2.92	2.69	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
cell division cycle 45	0.0021	3.6	3.26	2.06	B7+ vs. CLA-/ITGB7- CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
hemoglobin subunit alpha 2	0.0022	8.09	6.53	9.09	CLA+ vs. CLA-/ITGB7- CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
LLGL2, scribble cell polarity complex component	0.0023	3.68	4.34	5.02	CLA+ vs. CLA-/ITGB7- CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
C-type lectin domain family 1 member B	0.0024	2.95	2.08	2.56	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
CD33 molecule	0.0026	4.63	2.89	3.48	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
5'-aminolevulinic acid synthase 2	0.003	3.88	2.73	4.6	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
linker for activation of T-cells family member 2	0.0032	3.94	2.46	2.52	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
MAF kZIP transcription factor 8	0.0032	5.06	3.71	4.22	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
capping actin protein, gelsolin like	0.0036	3.81	2.69	2.25	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
hemoglobin subunit alpha 2	0.0042	7.49	6.06	8.41	CLA+ vs. CLA-/ITGB7- CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
ZW10 interacting kinesin domain protein	0.0052	3.66	3.27	2.04	B7+ vs. CLA-/ITGB7- CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
asialoglycoprotein receptor 1	0.0057	3.67	2.34	2.84	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
leucine rich repeat neuronal 3	0.0065	2.32	3.26	2.36	CLA+ vs. ITGB7+ B7+ vs. CLA-/ITGB7-
urotensin 2	0.0065	3.33	2.52	2.34	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
galectin 3	0.0069	5	3.5	4.14	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
annexin A2	0.0069	6.03	4.81	4.42	CLA+ vs. CLA-/ITGB7- CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
fatty acid binding protein 5	0.0069	3.15	3.22	2.33	B7+ vs. CLA-/ITGB7- CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
hemoglobin subunit gamma 1	0.0069	5.29	3.54	5.44	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
solute carrier family 25 member 37	0.0082	3.15	2.7	3.76	B7+ vs. CLA-/ITGB7- CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
interleukin 13 receptor subunit alpha 1	0.0085	3.75	2.43	2.51	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
selenium binding protein 1	0.0086	4.04	3.28	4.65	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
sulfenase 2	0.0091	5.28	3.83	4.36	CLA+ vs. ITGB7+ CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
activator of HSP90 ATPase homolog 2	0.0091	2.4	3.01	3.28	CLA+ vs. CLA-/ITGB7- CLA+ vs. CLA-/ITGB7-
GIS complex subunit 1	0.0091	3.17	2.94	2.13	B7+ vs. CLA-/ITGB7- CLA+ vs. CLA-/ITGB7-

Rövidítések: ANOVA: variancia analízis, FDR: false discovery rate, CLA+: cután limfocita-asszociált antigén, ITGB7: integrin β 7

5.2.1.2 A PI16 emelkedett expressziója a bőr homingot mutató CLA⁺ T-sejtek sajátossága és független az aGvHD szervi érintettségétől.

Az összehasonlító transzkriptom analízis kimutatta, hogy a PI16 mRNS több, mint kilencszer nagyobb mennyiségben expresszáldódik a bőr homingot mutató (CD8 β ⁺/CLA⁺) szubpopuláció esetén, mint a bél homingot végző, vagy a referencia T-sejtek esetében (**27B Ábra**). Ezt látva elsőként kíváncsiak lettünk arra, hogy ez a bőrbe vándorló T-sejteken megfigyelt, emelkedett PI16 expresszió az aGvHD-nak esetleg csak a bőrt érintő manifesztációjában alakul ki (csak kután aGvHD) vagy minden, a bőrt is

érintő manifesztációjára jellemző (kután és kután+ gasztrointesztinális aGvHD is), avagy az aGvHD-ra általánosságban, esetleg valamennyi aHSCT-s betegre jellemző (**27B Ábra**, Kétutas RM ANOVA, $p < 0,0001$). Megállapítottuk, hogy a bőr-homingot mutató T-sejt szubpopulációban a PI16 mind a három aGvHD csoportban (kután aGvHD, gasztrointesztinális aGvHD, mindkét fajta aGvHD manifesztáció egyidejűleg), illetve az aHSCT-n átesett, de aGvHD által nem érintett betegcsoportban is emelkedett expressziót mutatott. Ezek az adatok tehát azt mutatták, hogy a bőrbe vándorló T-sejteken emelkedett PI16 expresszió nem korlátozódik semelyik aGvHD szervi érintettségre, sőt a jelenség aGvHD-kapcsolt fenoménnek sem tűnik, lévén az aGvHD-mentes aHSCTs kontrollesoportban is reprodukálható volt. Ezeket az eredményeket Q-PCR segítségével is meg tudtuk erősíteni (**27C és D Ábra**, Kétutas RM ANOVA, $p < 0,0001$). Végül a flow citometriás mérések is alátámasztották az RNS- szinten kapott eredményeket, miszerint a PI16 fehérje expressziója 10,9x gyakoribb volt a CLA+/CD8+ szubpopuláció esetében, mint a referencia csoportban (**27E-G Ábra**), míg az ITGB7+/CD8+ csoporttal összehasonlítva 5,2x-es emelkedést tapasztaltunk (**27E Ábra**, Kétutas RM ANOVA, $p=0,0004$). Ez a fehérje-szintű megfigyelés, teljes összhangban az RNS adatokkal, ismét minden vizsgált betegcsoport esetében igaznak bizonyult, függetlenül az aGvHD szervi érintettségétől (**27F Ábra**, Kétutas RM ANOVA, $p=0,9388$). Ezek a megfigyelések azt sugallták, hogy a PI16 a bőr homingot mutató CD8+ T-sejt populációhoz társult, teljesen függetlenül az aGvHD szervi manifesztációjától, vagy akár az aGvHD mint olyan kialakulásától is.



27. Ábra: A PII6 kapcsolatának vizsgálata a CD8+T-sejt szervi homing szubpopulációkkal és aGvHD szervi érintettséggel microarray, Q-PCR és flow citometria segítségével.

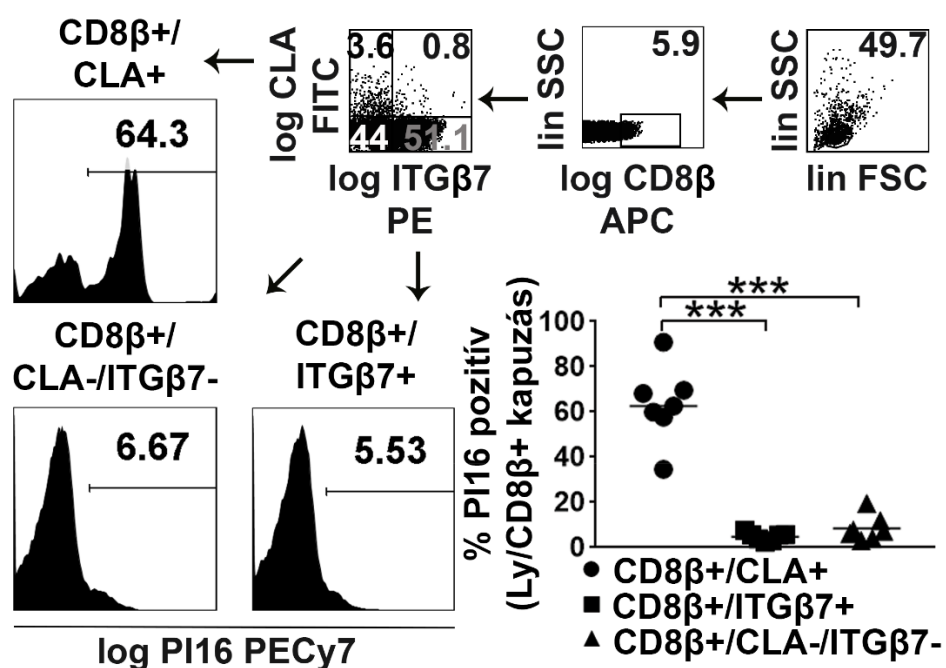
A) C) és E) A PII6 vizsgálata aHSCT-n átesett betegek mintáin, a különböző T-sejt szubpopulációk szerint, nevezetesen a bőrbe (CD8+/CLA+), a bélbe (CD8+/ITGβ7+), illetve egyik előbbi szervbe sem vándorló (CD8+/CLA-/ITGβ7-) populációkon microarray, Q-PCR és flow citometria segítségével. Jól látható, hogy a PII6 emelkedett expressziója a bőrbe vándorló (CD8+/CLA+) T-sejt szubpopuláció jellemzője, RNS és fehérje szinten is. (Egyutas ANOVA FDR korrekcióval, *** $p < 0,001$)

B) D) és F) A PII6 vizsgálata a különböző beteg típusok szerint, után aGvHD, gasztrointesztinális aGvHD és mindkettő után + gasztrointesztinális aGvHD esetén, illetve az aHSCT-n átesett, de aGvHD kialakulás nélküli csoportban, microarray, Q-PCR és flow citometria segítségével. A PII6 emelkedett expressziója betegség függetlenül a bőrbe vándorló CD8+/CLA+ T-sejt szubpopuláció jellemzője. (Kétutas RM ANOVA FDR korrekcióval, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

G) Reprezentatív flow citometriás mérés egyetlen beteg mintáján. A számok a kapuzott T-sejtek százalékos gyakoriságát mutatják a jelzett kapuban.

5.2.1.3 *A PI16 fehérje társulása a bőr homingot mutató CD8+ T-sejt szubpopulációval egészségesben és betegségben*

Mivel az előzőekben részletezett eredmények alapján azt tapasztaltuk, hogy a PI16 emelkedett expressziója robusztusan, aGvHD-független módon asszociál a bőrbe vándorló CD8+ T-sejtek homing fenotípusával, kíváncsiak lettünk, hogy az RNS- és fehérjeszinten kapott eredményeinket esetleg meg tudjuk-e erősíteni aHSCT-n át sem esett, teljesen egészséges véradók mintáin is. Ezzel tisztázni szeretnénk volna, hogy a PI16 emelkedett expressziója az aHSCT következménye, vagy egy csak aHSCT-ben megfigyelhető jelenség-e, vagy inkább a bőrbe vándorló CD8+ T-sejtek *bona fide* betegség-független, akár univerzális markere lehet. Ennek eldöntésére egészséges önkéntesek vérmintáiból először PBMC-eket, majd a három CD8+ T-sejt szubpopulációt (bőr homingot mutató, bél homingot mutató és referencia csoportok) is ismét izoláltuk. A flow citometriás mérések megerősítették a microarray adatokat, sőt, egészséges véradókban a PI16 kifejeződése tekintetében még robusztusabb emelkedés látszott az egyes homing szubpopulációk között, mint az aHSCT-n átesett betegek mintái között. A bőrbe vándorló CD8+ T-sejt szubpopuláció esetén a sejtek átlagosan 63%-a volt PI16+, amely 13,3x-osa volt a bélbe vándorló és 7,5x-szerese a referencia szubpopulációban kapott eredményeknek (**28. Ábra**: Kétutas RM ANOVA, $p < 0,0001$). Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a PI16 kifejeződése a bőrbe vándorló CD8+ T-sejt szubpopuláció alapvető, és egészséges immunrendszerben még kifejezettebb jellegzetessége, amely független az aGvHD, illetve az aHSCT hatásától (**28. Ábra**). A továbbiakban ezért a PI16-nak a bőrbe vándorló T-sejtekben játszott szerepének vizsgálatát egészséges véradók mintáin folytattuk tovább.



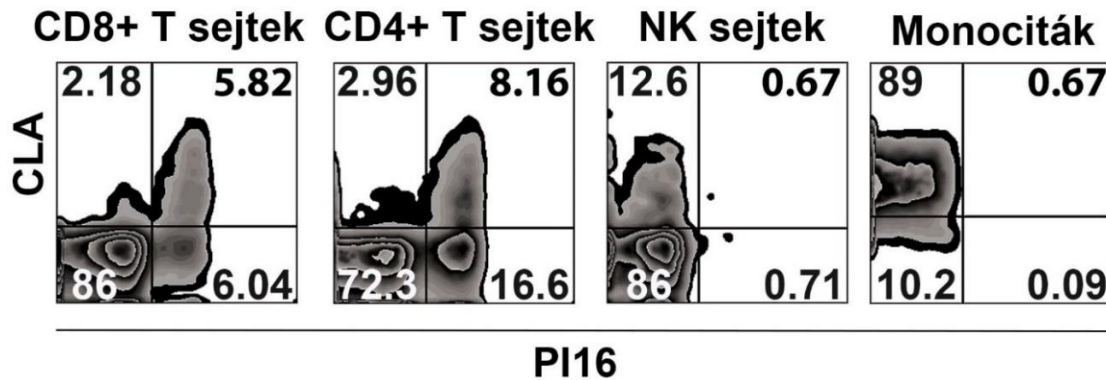
28. Ábra: A PI16 kifejeződésének vizsgálata egészséges vérdonorok bőrbe (CD8 β + CLA+), bélbe (CD8 β + ITG β 7+), és sem bőrbe, sem bélbe nem vándorló (CD8 β + CLA-, ITG β 7-) referencia CD8 β + T-sejtjein, flow citometriával. Fent: kapuzási stratégia, a számok a kapuba eső sejtek százalékos értékét mutatják. Balra: egy reprezentatív minta CD8 β + T-sejt homing szubpopulációi. Jobbra: 7 egészséges vérdonor mintájának egyutas RM ANOVA vizsgálata FDR korrekcióval, ***p < 0,001.

5.2.2 A PI16, mint a bőrbe vándorló CD8 β + T-sejt szubpopuláció jellemző markerének validálása egészséges mintákon

5.2.2.1 A PI16 kizárólagos jellegzetessége a nem naív, bőrbe vándorló T-sejteknek, mely a bőrbe lépést követően is stabil marad

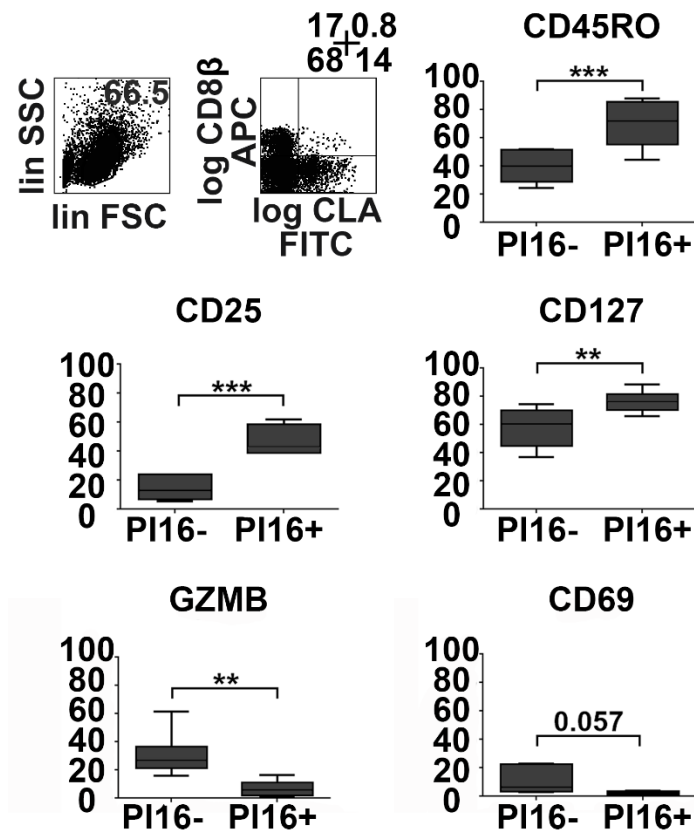
Mint az előzőekben láthattuk, elsődleges adataink alapján a PI16 a bőrbe vándorló, vagyis a CLA β + CD8 β + T-sejtek jellegzetességének tűnt. Mivel azonban a CLA nem egy kizárólag T-sejteken kifejeződő marker, hanem számos más leukocitán is megtalálható, tisztázni szeretnénk volna, hogy a PI16 kifejeződése pusztán a CLA-hoz köthető, azaz más CLA β + sejtcsoportokon is megjelenik, vagy kizárólag a bőrbe vándorló T-sejtekhez kapcsolt jelenség. Flow citometriás analízisben sikerült igazolnunk, hogy a PI16 emelkedett expressziója T-sejt specifikus, hiszen csak a CD8 β + és CD4 β + T-sejtekre korlátozódik, míg CLA-t expresszáló NK-sejteken vagy monocitákon való megjelenése elhanyagolható volt (**29. Ábra**). Ez az eredmény azt mutatja, hogy a PI16 a T-sejtekhez kapcsoltan,

kizárólagosan a bőrbe vándorló T-sejteken, és nem pusztán CLA függő módon jelenik meg.



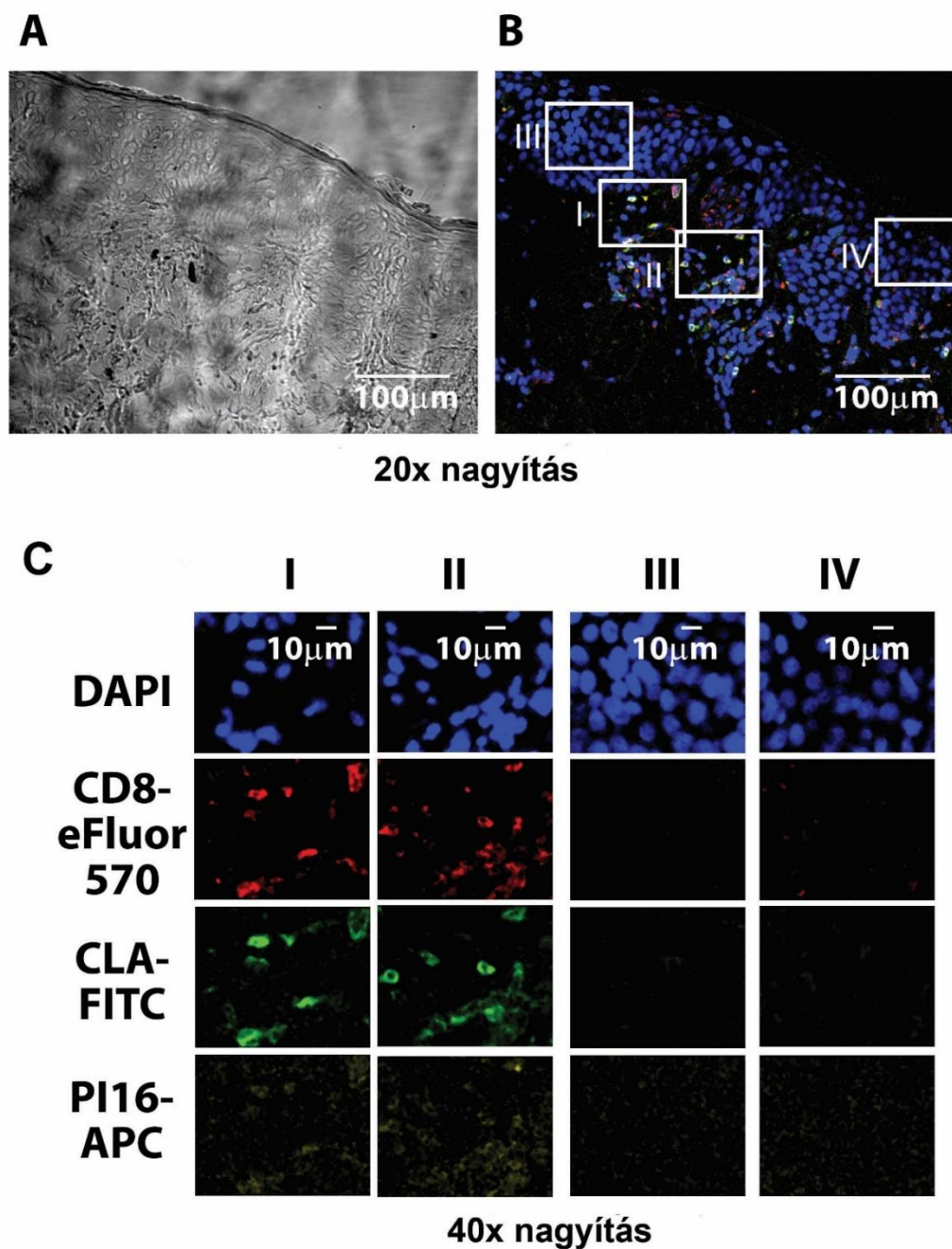
29. Ábra: A PI16 vizsgálata különböző CLA+ PBMC sejtpopulációkon, flow citometria segítségével. Vizsgált T-sejtpopulációk balról jobbra haladva: CD8+ T-sejtek, CD4+ T-sejtek, NK-sejtek, monociták. A számok a sejtek százalékos értékeit mutatják. a PI16 a T-sejtekhez kapcsoltn és nem CLA függő módon jelenik meg, így kizárólagos a bőrbe vándorló T-sejteken

Ezt követően kíváncsiak voltunk, hogy ezeknek a CD8+ T-sejtek milyen érettségi állapotára jellemző a PI16 kifejeződése, így újabb flow citometriás mérést végeztünk, ahol összehasonlítottuk egymással a PI16+ és PI16- CTL frakciókat. Azt találtuk, hogy a PI16 kifejeződése elsősorban a CD45RO+, CD127+, CD25+ pozitív sejtek jellemzője, míg a Granzim B+ és CD69+ pozitív sejtek esetében kifejeződése ritka illetve igen gyenge volt (**30. Ábra**). Számos marker esetén, mint például az IFN γ vagy a CD40L esetén a két frakció között nem volt különbség (nem ábrázolt). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a PI16 jelenléte a sejtfelületen elsősorban inkább a nyugvó, nem naiv/memória fenotípusú CD8+ T-sejtek jellegzetessége, mintsem a nemrégiben aktiválódott, aktívan citotoxikus effektor sejteké.



30. Ábra: A PI16+ és PI16- populációk összehasonlítása flow citometria segítségével. A PI16 termelődés inkább a memória típusú bőrbe vándorló CD8+ T-sejtek jellegzetessége. Párosított T teszt, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Ezt követően kíváncsiak voltunk, hogyha a PI16 tényleg a bőrbe vándorló T-sejt szubpopulációk jellegzetessége, akkor vajon mi történik a PI16 termelődésével a bőrszövetbe való belépést követően. Az irodalomból már ismert, hogy például a CLA, mint homing marker expressziója a bőrbe lépést követően is folyamatosan megmarad (169), míg az $\alpha 4\beta 7$ integrin esetén a bél szövetbe lépést követően az $\alpha 4$ integrin lánc gyors leszabályozódását láthatjuk (170). Magyarán a T-sejtes homing markerek egy részére kifejezetten jellemző a célszervben való stabil expresszió, míg másokra nem: kérdésünk tehát az volt, hogy a PI16 vajon a kettő közül melyik kategóriába sorolódik. A vizsgálatokhoz humán bőr biopsziákat vizsgáltunk multiparametrikus fluoreszcens konfokális mikroszkópiával, és azt találtuk, hogy a CD8+/CLA+ T-sejtek a bőrben is expresszálták a PI16-ot (31. Ábra).

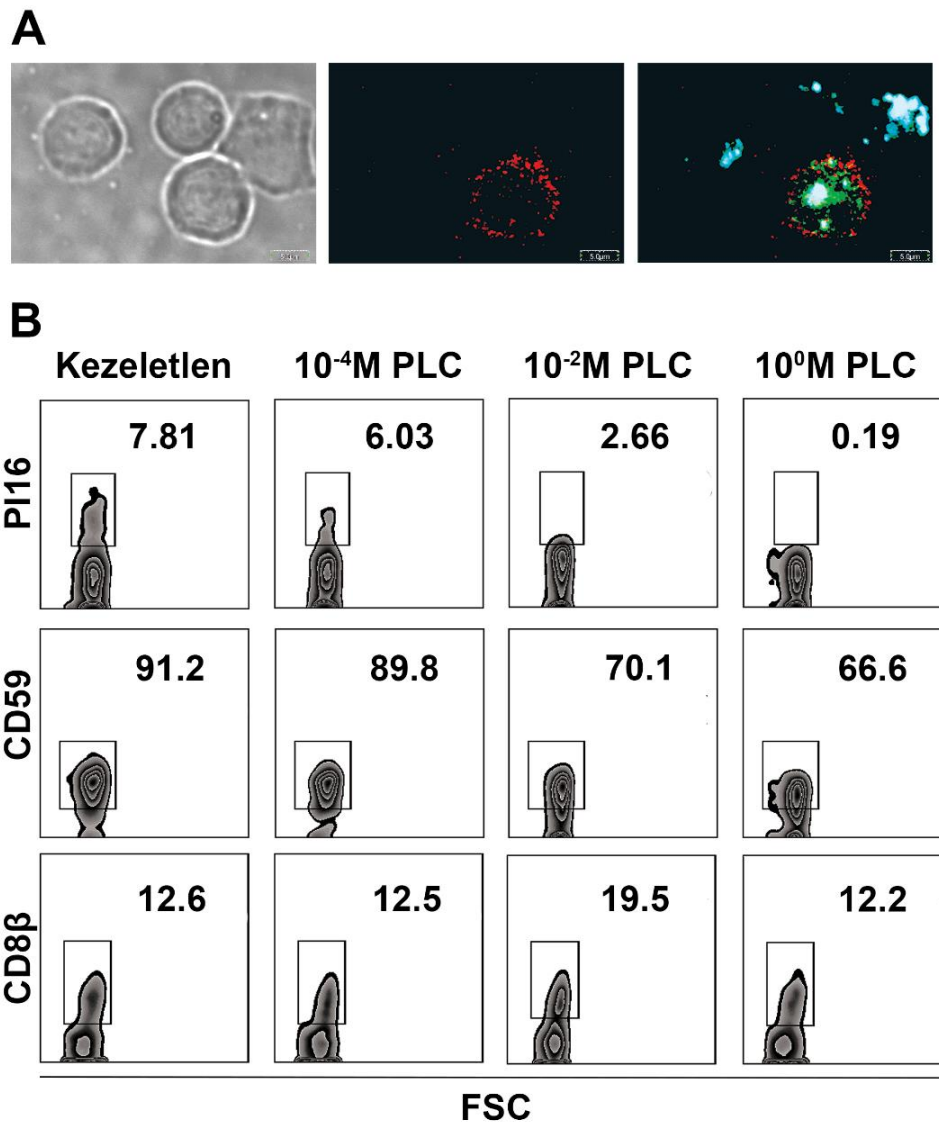


31. Ábra: A CD8⁺/CLA⁺ T-sejtek és a PI16 protein térbeli eloszlása az egészséges bőrben: fázis kontraszt mikroszkópia és konfokális mikroszkópia, többszínű fluoreszcens immunhisztokémia. A) Az epidermisz és a dermisz határa B) A fluoreszcensen festett T-sejtek elhelyezkedése a két rétegben. C) A B) kép I-IV szekciójának nagyítása látható. I-II a dermiszt, míg a III-IV az epidermiszt mutatja. Festés: Sejtmag-DAPI, CLA-FITC, CD8 β -eFluor 570 és PI16-APC.

Összhangban mások megfigyelésével (171), az epidermiszben a PI16-nak nagyon gyenge vagy teljesen hiányzó expresszióját láttuk, míg a dermiszben a protein elszórt megjelenése volt megfigyelhető. Eredményeink szerint ez az elszórt PI16 jel egyértelmű kolokalizációt mutatott a CD8+/CLA+ T-sejtekkel (**31. Ábra**).

5.2.2.2 A PI16 intracelluláris lokalizációja a bőr homingot mutató CD8+ T-sejtek membránjára korlátozott, és kikötése GPI-horgonnyal történik

A vizsgálataink kezdetén igen kevés információ állt rendelkezésünkre a PI16 fehérje funkciójával és lokalizációjával kapcsolatban. Maga a fehérje legelőször, mint a prosztatarák egy szolubilis markere került leírásra (172). Időközben azonban más tanulmányok beszámoltak a PI16 membránkötött (173) illetve GPI-horgonyzott (174) formáiról is például a Treg sejtek felszínén, avagy egér fibroblasztok esetén. Végül egyes adatbázisokban, mint feltehetően integráns transzmembrán doménnel rendelkező protein szerepelt. Ezért mindenképp fontosnak találtuk a bőrbe vándorló CD8+ T-sejtek esetén is megvizsgálni a PI16 intracelluláris lokalizációját, illetve a membránnal való viszonyának tisztázását. Ehhez flow citometriával és konfokális mikroszkópiával végeztünk vizsgálatokat. A konfokális vizsgálathoz CD8+ T-sejteket szortoltunk, és azt találtuk, hogy a PI16 a CD8+/CLA+ T-sejtek plazmamembránjában helyezkedik el, ám nem mutat tiszta kolokalizációt a CLA-val (**32A Ábra**). Mindez ismételtén arra utal, hogy bár a marker a CLA+ T-sejteken jelenik meg, a CLA-val sem szabályozás, sem lokalizáció tekintetében nem szorosan kapcsolt vagy társult fehérjéről van szó. Ezt követően már csak az maradt kérdéses, hogy a fehérje a membránba transzmembrán doménen keresztül, avagy GPI-horgonnyal kapcsolódik. Ennek kiderítésére különböző dózisban alkalmazott bakteriális PI-PLC kezelésnek vetettük alá a sejteket, mely a GPI horgonyok leemésztésére képes, azonban az integráns membrándoméneket nem károsítja, majd flow citometriával követtük a sejtfelszíni PI16 jelben bekövetkező változásokat. Egyértelművé vált, hogy a PI16 a sejtek felszínéről a PLC kezelést követően dózisfüggő módon eltűnik, hasonlóan a pozitív kontrollként használt CD59-el, amely egy ismert GPI horgonyzott fehérje. Ezzel szemben a negatív kontrollként használt CD8 esetében, amely közismerten nem GPI-horgonyzott, nem látunk ilyen hatást. Mindebből világossá vált tehát, hogy a PI16 GPI-horgonyon keresztül kapcsolódik a bőrbe vándorló CD8+ T-sejtek membránjába (**32B Ábra**).



32. Ábra: A PI16 CD8⁺ T-sejtekben történő intracelluláris disztribúciójának, és membránköttetés módjának vizsgálata.

A) MACS szortolt CD8⁺ T-sejtek fáziskontraszt, monokróm (PI16) és háromszínű (PI16, CLA és CD8) fluoreszcens mikroszkópiája. Kék színnel a CD8, zöld színnel a CLA, míg piros színnel a PI16 van jelölve. A PI16 a bőrbe vándorló CD8⁺ T-sejtek membránjában helyezkedik el.

B) A PI16 plazmamembránhoz történő asszociációjának vizsgálata. A plazmamembrán GPI horgonyok emésztése különböző dózisu bakteriális PI-PLC hozzáadásával történt. A PI16 mellett két kontrollt is alkalmaztunk: CD8 β , mint negatív kontroll (nem GPI horgonyzott) és CD59, mint pozitív kontroll (GPI-horgonyzott). A számok az adott dózisu kezelés mellett még az adott markerre pozitív sejtszám százalékot mutatják.

5.2.2.3 A PI16 szabályozása a bőrbe vándorló CD8+ T-sejtekben

5.2.2.3.1 A PI16 szabályozása független a CLA-étól és az egyéb ismert T-sejt homing markerekeitől

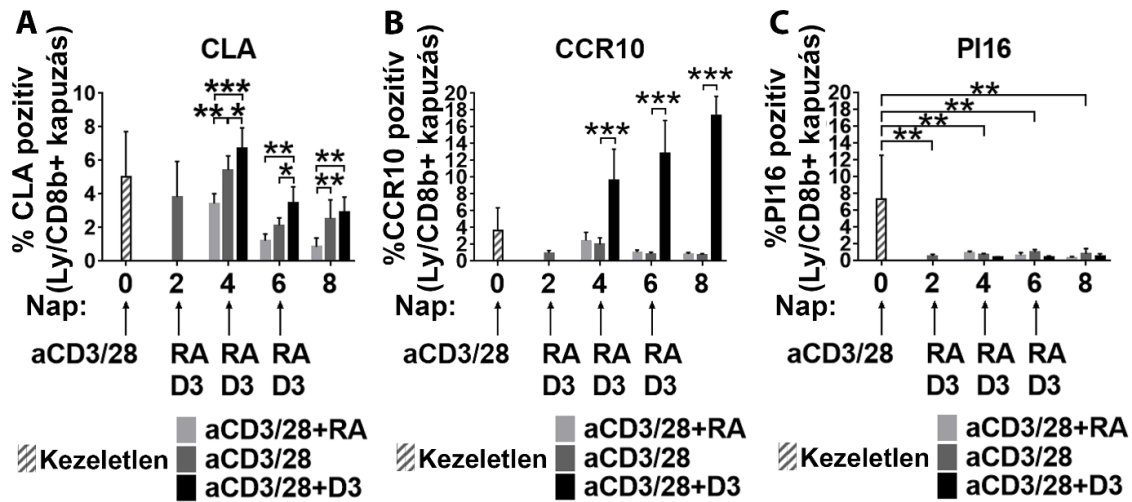
Ezt követően kíváncsiak voltunk, hogy mely folyamatok vesznek részt a PI16 szabályozásában, azaz megjelenésében a bőrbe vándorló CD8+ T-sejteken, avagy fordítva, alternatív hipotézisként, esetleges szuppressziójában a bélbe és egyéb szervekbe vándorló CD8+ T-sejtek felszínén. Az irodalomban már régen leírásra került, hogy aktivált CD8+ T-sejtek homing programjait erősen befolyásolják, ha meg nem szabják az antigént prezentáló APC-k, elsősorban DC-k és azok mediátorai.

Ismert, hogy aktiválódó T-sejtek *in vitro* expozíciója az antigént prezentáló DC-k által termelt D3 vitaminra vagy retinsavra bizonyos, bár nem az összes bőr- és bélirányú homingban résztvevő markerek megjelenését befolyásolhatja, fokozhatja, illetve gátolhatja. Ennek oka, hogy e kétféle homing program bevéssődése egymást kölcsönösen kizáró folyamat, amelyben adott szabályozó faktor nem csak az általa kiváltott program előmozdításával, hanem az alternatív homing programok gátlásával is hathat. (175, 176). Ebből a megfontolásból kíváncsiak voltunk arra, hogy ezek a faktorok játszanak-e valamilyen szerepet a PI16 szabályozásában, kifejeződésének erősítésében vagy gátlásában.

In vitro aCD3/28, IL-2 illetve IL-12 jelenlétében aktivált CD8+ T-sejteket, vitamin D3-ra és retinsavra exponálva, kontroll kísérletekben meggyőződünk róla, hogy a kezelések jól működtek. Az irodalomban leírtaknak megfelelően a D3 vitamin, mint a bőr-homingot előmozdító faktor képes volt emelni a CLA expresszióját (**33A Ábra** Kétutas RM ANOVA, $p=0,0049$) és aktiválni a CCR10 megjelenését (**33B Ábra** Kétutas RM ANOVA, $p=0,0015$), míg az aktivált CD8+ T-sejteken, a retinsav csökkentette a CLA kifejeződését. Ezzel együtt azt találtuk, hogy sem a D3 vitamin, sem pedig a retinsav nem volt hatással a PI16 termelődésére (**33C Ábra**). Jól látszott továbbá az is, hogy az aktiválásra használt aCD3/CD28 a PI16 nagyon gyors leszabályozódását okozta az aktivált CD8+ T-sejtek felszínén (**33C Ábra**).

Mindez ismét aláhúzza azt, hogy a PI16 a CLA-tól független, attól nemcsak sejtek közötti vagy sejten belüli disztribúciójában, hanem még szabályozásában is eltérő homing marker, illetve azt is, hogy a PI16 inkább a nyugvó memória jellegű, mintsem a granzim B+ citotoxikus, effektorsejtek markere. A standard, általunk is alkalmazott aCD3/28+ IL-2 aktivációs protokollok ugyanis elsősorban a frissen aktivált, granzim B+, citotoxikus,

elsősorban PI16- effektorsejtek képződését támogatják mintsem a nyugvó, gyakrabban PI16+ memóriasejteket.

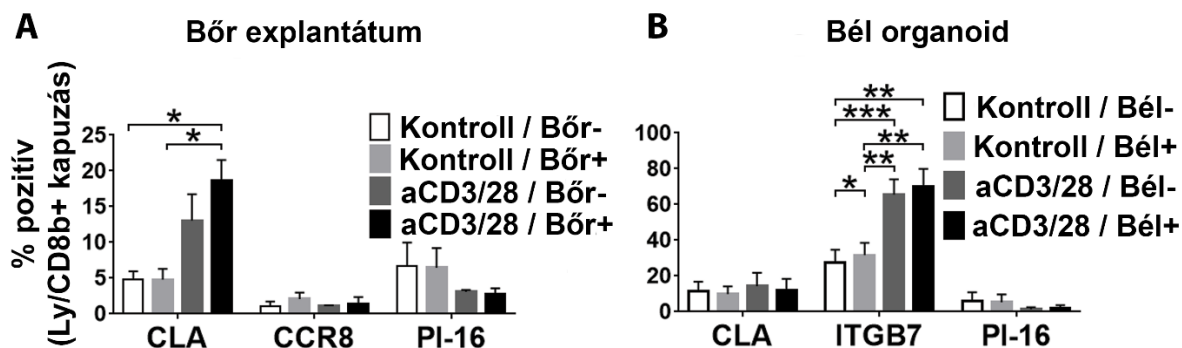


33. Ábra: A PI16 expresszió szabályozásának vizsgálata aktivált, naiv CD8+ T-sejteken. Alkalmazott kezelések: vitamin D3 és retinsav (RA). Vizsgálati időpontok: aCD3/28+ IL-2 aktiváció napjától (0. nap) a 8. napig, kétnaponta. A) a CLA, B) a CCR10 és C) a PI16 expressziójának szintje az aktivációt követően, a kétféle vitaminkezelés mellett, illetve kontroll sejtekben.

Miután láttuk, hogy a DC mediátorai nincsenek hatással a PI16 expressziójára, kíváncsiak voltunk, hogy esetleg a helyi epithélium és az abból származó mediátorok befolyásolhatják-e a PI16 megjelenését. Egy nagy feltűnést keltett cikkben ugyanis azt vetették fel, hogy akár a bőr epithélium sejtei által kibocsájtott szolubilis mediátorok is képesek lehetnek elérni a legközelebbi nyirokcsomókat, és ott hozzájárulhatnak a CD8+ T-sejtek bőr irányú homingra programozásában, amennyiben fokozzák CLA és CCR8 expressziójukat (177).

Ennek tesztelésére CD8+ T-sejteket aktiváltunk, majd kokultúrában tartottuk őket élő bőr explantátumokkal és 3D bél organoidokkal, ismét feltételezve azt, hogy bőr epithél sejtek esetleg támogathatják, míg béleredetű sejtek esetleg éppen ellenkezőleg, leszabályozhatják a PI16 kifejeződését az elköteleződő CD8+ T-sejteken. A kontrollkísérletek tanúsága szerint a kísérleti rendszerek itt is működtek, hiszen a bőr explantátum képes volt, igaz kis mértékben, emelni a CLA expresszióját, még a bél organoidok jelenléte a $\beta 7$ integrin kifejezésének fokozódását okozta. Ám sem a bőr, sem

pedig a bél epithél sejtek jelenléte nem befolyásolta a PI16 megjelenését a frissen aktivált CD8⁺ T-sejteken (**34A és B Ábra** Kétutas RM ANOVA $p > 0,05$).



34. Ábra: A bőr és a bél jelenlét szabályozó hatásának vizsgálata a bőr- illetve bél homing markerek és a PI16 expressziójára.

A) A bőr explantátum jelenlétének hatása az aktivált CD8⁺ T-sejteken elhelyezkedő CLA, CCR8 és PI16 expressziójára 4 napos kokultúrát követően.

B) Bél organoid jelenlétének hatása az aktivált CD8⁺ T-sejteken található CLA, ITGB7 és PI16 expressziójára 4 napos kokultúrát követően.

Mindkét esetben az oszlopok a százalékos pozitivitást mutatják a 0. napi, aktiválatlan kontrollhoz képest. Statisztika: FDR korrigált kétutas ANOVA, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Tehát összességében elmondható, hogy a PI16 szabályozása a bőrbe vándorló CD8⁺T-sejteken függetlennek bizonyult minden olyan ismert, irodalomban leírt faktortól, amelyek szerepet játszanak más bőr-homing markerek megjelenésében, és különösen, illetve egyértelműen független azoktól, amelyek fontosak a CLA befolyásolásában.

5.2.2.3.2 A PI16 aktiváció-függő eltűnése a citotoxikus effektor sejtekről gyors, szorosan kontrollált, RNS szinten-szabályozott folyamat

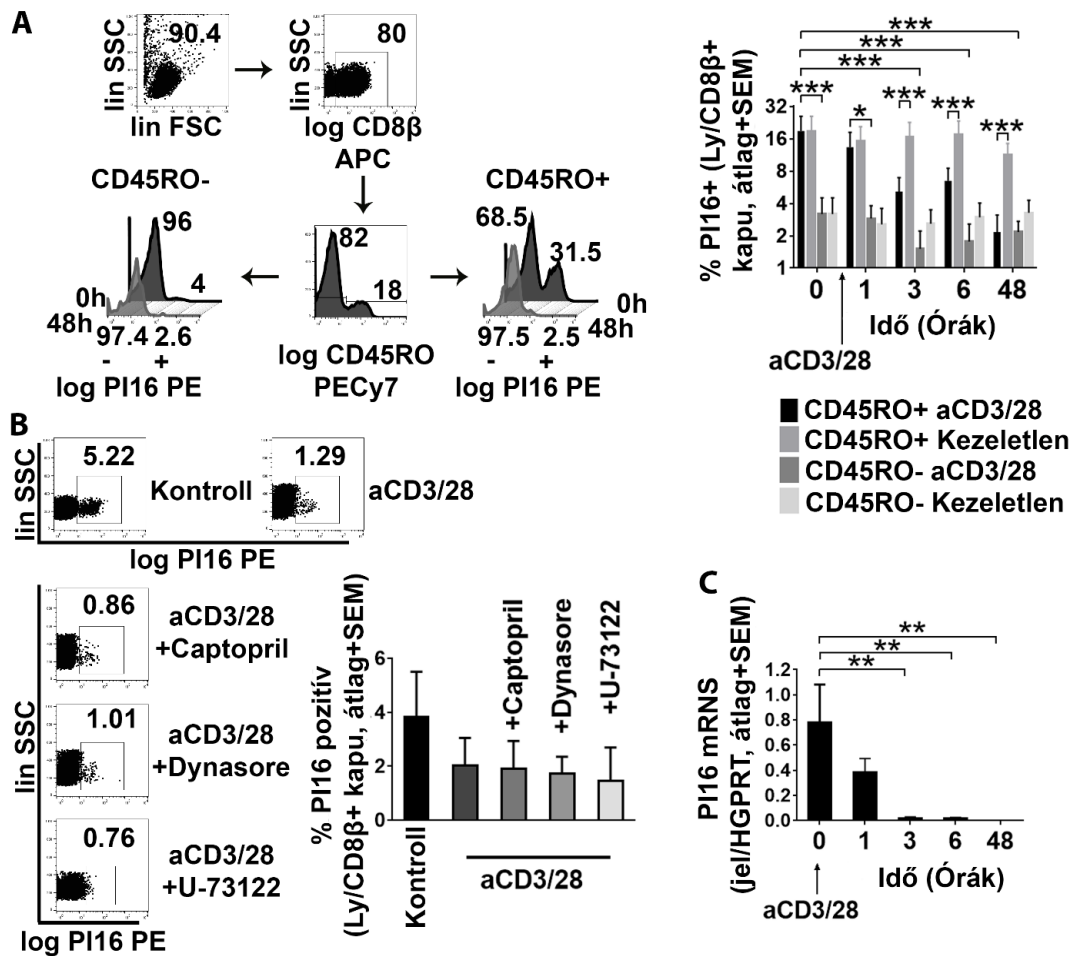
Az előzőek alapján elmondható, hogy a PI16 szabályozásában semmilyen ismert homing faktor nem játszik szerepet. A PI16-ra egyedül az aktivációnak volt hatása, lévén a citotoxikus effektor sejté érése a PI16 gyors eltűnését okozta a bőrbe vándorló CD8⁺ T-sejteken (**33C Ábra**). Mivel korábban kimutattuk, hogy azok a bőrbe vándorló CD8⁺ T-sejtek, melyek expresszálják a PI16-ot, valójában nyugvó, nem citotoxikus, memória-szerű fenotípust mutató CD45RO⁺ T-sejtek (**30. Ábra**), kíváncsiak voltunk, hogyha

ezeket a memória-jellegű sejteket újra aktiváljuk, és citotoxikus effektor sejtekké alakítjuk, akkor mi történik a PI16 expressziójával. Azt találtuk, hogy a CD45RO⁺ T-sejteket aCD3/28-al és IL-2-vel újra aktiválva a PI16 expresszió majdnem teljes eltűnése következett be az aktivációt követő 48 órán belül (**35A Ábra** Kétutas RM ANOVA, $p=0,0002$).

Ezután szeretnénk volna felderíteni a mechanizmust, ami a PI16 eltűnésének hátterében áll. Figyelembe véve, hogy a PLC aktiváció a T-sejt aktiváció elengedhetetlen része, és nem csak a kezelésként adott bakteriális PI-PLC, hanem az eukarióta szingalizációban résztvevő PLC is képes dezintegrálni a GPI horgonyokat, azt feltételeztük, hogy a PLC útvonal aktivációja a T-sejtekben talán a GPI horgony levágásán keresztül szerepet játszhat a PI16-nak a sejtek felszínéről való eltűnésében. Alternatív hipotézisünk volt, hogy ez egyéb GPI-horgonyt levágó enzimek révén, vagy esetleg a horgonytól függetlenül, a protein sejtfelszínről való endocitotikus visszahívásával is megtörténhet akár.

Ezért további kísérleteink során a CD8⁺ T-sejt reaktiváció alatt egyrészt gátoltuk a PLC aktivitást U-73122-vel, másrészt gátoltuk az angiotenzin konvertáló enzim (ACE), egy alternatív GPI eltávolító enzim aktivitását Captoprillel (178, 179), illetve a dinamin inhibitor Dynasore segítségével leállítottuk az endocitózist, hátha így gátolható a PI16 eltűnése a T-sejt aktivációt követően.

Azt találtuk, hogy a PI16 aktiváció során bekövetkezett eltűnése nem volt gátolható egyik reagenssel sem, tehát sem a PLC inhibíció, sem az endocitózis blokkolása, sem pedig ACE gátlása nem volt hatással a jelenségre (**35B Ábra**). Ezt követően megvizsgáltuk az aktiváció hatását RNS szinten is Q-PCR-el és azt találtuk, hogy aktivációt követően a CD8⁺ T-sejtek szinte azonnal beszüntették a PI16 mRNS expressziójukat, amit szorosan követett a fehérje szintű eltűnés a sejtek membránjából (**33C Ábra**). Ezen adatok azt mutatják, hogy a bőr homingot mutató memória fenotípusú CD8⁺ T-sejtek újraaktivációjuk során gyors transzkripció downregulációval veszítik el PI16 expressziójukat, és az eltűnés nem fehérje endocitózissal vagy a GPI horgony levágódása révén megy végbe.



35. *Ábra:* A CD45RO+/CD8+ T-sejtek újra aktivációjának hatása a PI16 expresszióra és a folyamat mechanizmusának vizsgálata.

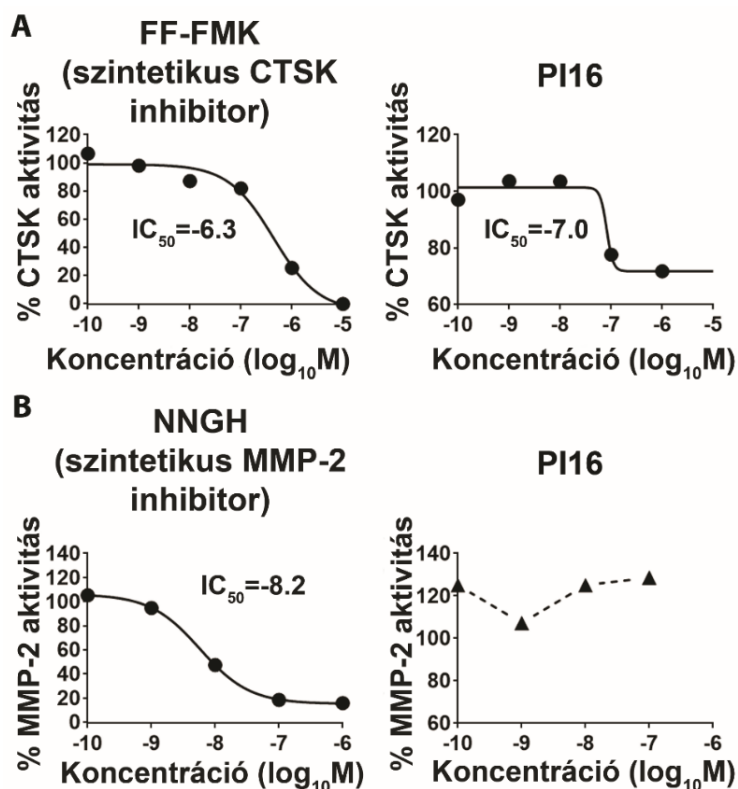
A) A PI16 expressziójának vizsgálata CD8+ /CD45RO+ és CD8+/CD45RO- szubpopulációkon aktiváció előtt és aktivációt követően. Az aktivációt anti-CD3/28-al végeztük. Statisztika: Kétutas ANOVA, FDR korrekcióval, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

B) A PI16 expressziójának követése flow citometriával, anti-CD3/28 aktivációt követően, inhibitorok jelenlétében és a nélkül. Használt inhibitorok: Dynasore, U-73122 és Captopril.

C) A PI16 mRNS mozgásának vizsgálata Q-PCR segítségével, anti-CD3/28 aktivációt követően. Statisztika: Egyutas ANOVA FDR korrekcióval, ** $p < 0,01$.

5.2.2.4 A PI16 funkciója a bőrbe vándorló T-sejteken: a PI16 a katepszin K gyulladáso proteáz szelektív, részleges inhibítora

A bőr-homingra programozott CD8+/CLA+/CD45RO+ T-sejtek újraaktivációja jellemzően a bőrben megy végbe, ahol egy lokális immunválasz során a környezetben számos gyulladási faktor, proteáz és patogén van jelen. Feltételezhető tehát, hogy a PI16 eltűnése ezekről a sejtekről a bőrben fejt ki hatását, bármi is legyen az. Mivel a PI16 funkcióját tekintve jórészt ismeretlen fehérje, peptidáz inhibitor funkciója is inkább csak feltételezett, ugyanakkor a bőrben tűnik el a reaktiválódó T-sejtek felszínéről, ezért mindenképpen szeretnénk volna tesztelni a PI16 feltételezett inhibitor funkcióját számos, a bőrre jellemző proteáz aktivitására. Korábban egérmodellekben már felvetődött a PI16 gátló funkciója a katepszin K (174) és a mátrix metalloproteáz 2 (MMP2) (180) bőrben is kifejeződő gyulladáso proteázok esetében, ám humán vizsgálatok eddig még nem álltak rendelkezésre. Az általunk elvégzett proteáz inhibitor vizsgálat kimutatta az egereken végzett kísérlettel összhangban (174), hogy a PI16 részleges inhibitora a humán katepszin K-nak (**36A Ábra**). Másfelől azonban, a mi kísérleteinkben legalábbis, a PI16 nem volt hatással a humán MMP2 proteolitikus aktivitására (**36B Ábra**).



36. Ábra: A PI16 inhibitor funkciója humán katepszin K és MMP2 esetén. A)-B) Relatív humán katepszin K (CTSK) és MMP-2 aktivitása, nagy hatású szintetikus inhibitorok és a rekombináns humán PI16 jelenlétében, azok koncentrációjának függvényében. IC₅₀: A maximális inhibitor hatás felét kiváltó inhibitor koncentráció (nem-lineáris regresszióval kalkulálva)

Miután szisztematikus vizsgálatról a PI16 ligandjai tekintetében közlemény még nem született, feltételeztük, hogy a PI16 mint proteáz inhibitor esetleg egyéb, az irodalomban még nem vizsgált proteázokkal, bőr proteázokkal is interakcióba léphet.

Ennek a kérdésnek a vizsgálatára egy pull-down vizsgálatot végeztünk a PI16-tal mint bait-tel, és bőr proteázokkal mint potenciális ligandokkal egy reakcióterben. A PI16 által lekötött fehérjéket ezután egy proteom profiler array vizsgálatban elemeztük a lekötött bőr proteázok azonosítása végett (**13. és 14. Ábra**). A pull-down vizsgálat során a szeparáló oszlopra PI16 fehérjét kötöttünk ki (ez volt az elkapó fehérje), míg egy másik oszlopra semmit nem kötöttünk (ez volt a PI16- oszlop, tehát a kontroll) majd az oszlopokhoz humán bőr lizátumát, teljes protein izolátumát adtuk.

Mindkét oszlop estében megtartottuk az átfolyó frakciókat (ez az a minta, ami nem kötődött fel az oszlopra) és a végső eluátumokat (azt a frakciót, amely az oszlophoz, vagyis a PI16-hoz kötődött fehérjéket tartalmazza).

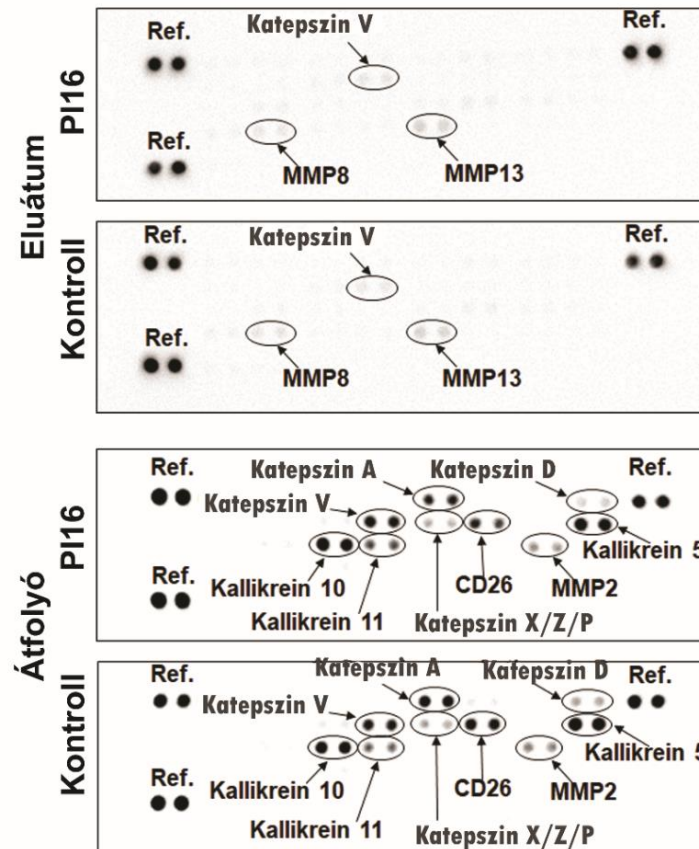
Ezt követően mindkét oszlop mindkét frakcióját proteom profiler array-en vizsgáltuk, mely 34 különféle, többek között a bőrben is kifejeződő humán proteáz vizsgálatára, azaz azonosítására és szemikvantitatív mennyiségi összehasonlítására alkalmas (**37Ábra**). Az array-en található bőr proteázok listáját a **10. Táblázat** tartalmazza.

10. Táblázat: A proteom profiler array-en található bőr proteázokra specifikus ellenanyagok listája. Rövidítések: ADAM: dezintegrin és metalloproteáz család, MMP: mátrix metalloproteázok, DPPIV: Dipeptidyl peptidáz 4, PSA: Prosztata specifikus antigén, uPA: urokináz-típusú plazminogén aktivátor

ADAM8	Katepszin B	Katepszin S	Kallikrein 5	Kallikrein 13	MMP-8	Nepilysin/CD10
ADAM9	Katepszin C	Katepszin V	Kallikrein 6	MMP-1	MMP-9	Persenilin
ADAMTS1	Katepszin D	Katepszin X/Z/Y	Kallikrein 7	MMP-2	MMP-10	Proprotein konvertáz 9
ADAMTS13	Katepszin E	DPPIV/CD26	Kallikrein 10	MMP-3	MMP-12	Proteináz 3
Katepszin A	Katepszin L	Kallikrein 3/PSA	Kallikrein 11	MMP-7	MMP-13	uPA/Urokináz

Az összehasonlító analízis nem tudta kimutatni a PI16 nagy affinitású kötődését egyik vizsgált proteázhoz sem, így, az inhibitor assay-ekkel összhangban az MMP2-höz sem (a katepszin K-ra az assay nem tartalmaz antitesteket, (**37. Ábra**)). A vizsgálat eredményei szerint az átfolyó és eluált frakciók nem mutattak nagy eltérést a PI16-ot hordozó és az azt nem hordozó oszlopok között, és az eluátum is csak nyomokban tartalmazott

fehérjéket. Vagyis specifikus kötődésre vagy interakcióra a PI16 és más bőr proteázok esetében nem találtunk meggyőző bizonyítékot.



37. Ábra: A pull-down vizsgálat során nyert 4 féle frakció (eluátum és átfolyó frakciók PI16 fehérjét tartalmazó vagy nem tartalmazó (kontroll) gyöngyökkel preparált oszlopról) a bőrre legjellemzőbb 34 proteáz proteom profiler array analízise.

Összességében ezek az adatok azt sugallják, hogy a humán PI16 a bőrbe vándorló CD8+ T-sejteken funkcióját tekintve részleges inhibítora a katepszin K-nak az emberi bőrben, azonban nem kötődik nagy affinitással más bőr proteázokhoz.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1 Act-mOVA aGvHD modell

Munkám során elsőként olyan új, az irodalomban még le nem írt egér aGvHD modell felállítását tűztük ki célul, amely a klinikumhoz közeli körülményeket és a betegekben lejátszódó aGvHD folyamatokat minél jobban reprodukálni képes. Emellett robosztus, reprodukálható aGvHD-t vált ki, minden érintett célszervben, ugyanakkor a CD8⁺ T-sejtek aktivitása a rendszerben homogén, antigén-specificitása uniform, és ezért a modell experimentálisan könnyen vizsgálható, immunológiailag tiszta rendszert alkot. A modell alapját két kereskedelmi forgalomban elérhető egértörzs, a C57BL/6 OT-I és a C57BL/6 Act-mOVA törzsek adták. E két törzs, mint donor és recipiens felhasználása mellett végrehajtott egér experimentális HSCT-ben, a donor OT-I CD8⁺ T-sejtek a transzplantációt követő 4-7. napon belül, 100%-ban letális aGvHD-t okoztak a recipiens Act-mOVA egerekben. A modellben a recipiens és donor állat MHC szinten azonos volt, azonban egyetlen, pontosan ismert minor antigén (OVA) tekintetében különbözött, tehát első közelítésben a klinikumban a teljes HLA egyezés mellett végrehajtott MUD aHSCT egy speciális, különösen tiszta modelljeként fogható fel. Mivel a humán aHSCT-k nagy része MUD transzplantáció, modellünk jobban reprodukálja a klinikai körülményeket, mint a hagyományos modellek döntő többsége. Az ilyen modellekben ráadásul rendszerint számos, jórészt ismeretlen MHC és minor antigén tekintetében eltérő donor és recipiens felhasználásával alakítják ki az aGvHD-t, ami igen komplex, antigén- és T-sejt szinten is nehezen lekövethető összetett immunválaszokhoz vezet a célszervekben. Ezzel szemben a modellben az aGvHD kiváltása egyetlen minor antigénben való eltérése alapján, ami kísérletes szempontból nézve nagyon nagy előny.

A kifejlesztett modell design-ját tekintve részben hasonló a mások által már leírt K14-OVA/OT-I modellrendszerhez (129). A K14 modellben is a donor állatból (OT-I) származó CD8⁺ T-sejtek fel a csirke ovalbumin miHA SIINFEKL peptidjét, melyet a recipiens állat (K14-OVA) a célsejtjein a H2^{Kb} MHCI-molekulán keresztül prezentál. E hasonlóságon túllépve azonban a modellek között számos jelentős különbség is van. Az első szembeötlő különbség természetesen, hogy a K14-OVA modell esetében a csirke ovalbumin kifejeződése a szűk aktivitású citokeratin 14 promóter, és nem az ubikviter csirke aktin promóter irányítása alatt történik. Mivel a citokeratin 14 jellemzően a bőrben aktív promóter, a célantigén kifejeződése jórészt a bőrre korlátozódik. Emellett ebben a

modellben nem történik TBI kondicionálás, így nem meglepő, hogy a K14-OVA rendszer csak enyhe tünetekkel jelentkező kután aGvHD kialakítására képes, míg a többi szervben nem alakul ki aGvHD-s érintettség (92, 129). Ezzel szemben saját modellünkben, a K14 promóternek a csirke beta-aktin (Act-mOVA) promóterre történő cseréjének és az alkalmazott TBI-nek, azaz az aGvHD kialakulásának egyik fő hajtómotorjának együttes hatására az aGvHD által érintett szervek szinte mindegyikében kialakult a betegség (181). Váratlan módon azonban az egyetlen szerv, mely az Act-mOVA rendszerben nem mutatta az aGvHD-ra jellemző fenotípust, pontosan a bőr volt.

Ennek az érdekes jelenségnek a hátterében feltehetően több faktor, elsőként természetesen az antigén kifejeződését irányító promóterek eltérő szervspecifikus aktivitása áll. Míg a beta-aktin promóter a legtöbb sejtben aktív, addig a K14 promóter kifejeződése inkább a bőrben és az epithél sejteken jellemző (182). Bár egyik ismert aGvHD egérmodell sem tudja teljes mértékben reprezentálni a klinikumban alkalmazott terápiás eljárásokat, és így a betegekben lejátszódó aGvHD-t sem, mégis érdekes, hogy az Act-mOVA rendszer a miHA mismatch minden szervre kiterjedő jelenléte ellenére, várakozásainkkal szemben is, képtelen volt CD8+ T-sejtes választ, és aGvHD-s tüneteket okozni a bőrben. Ez több szempontból is meglepő. Egyrészt, mert bizonyított tény, hogy az Act-mOVA egerek bőr epithéliális sejtjeiben és szőrtüszőiben is megtalálható a csirke ovalbumin, melyek az aGvHD kialakulásának célpontjai, vagyis nem arról van szó, hogy ez a miHA a promóter aktivitás korlátai miatt egyszerűen nincsen jelen a bőrben, vagy annak kritikus célsejtjeiben (58). Ezen túlmenően mindkét modell, a K14-OVA és az Act-mOVA aGvHD rendszer is membránkötött ovalbumint prezentál, amely a szolubilis OVA formával ellentétben könnyebben alakít ki crossprezentációt a helyi APC-vel, így indukálva a hatékony CD8+ T-sejt választ aGvHD-ban (183). Mindez pedig arra utal, hogy a bőr aGvHD elmaradásának hátterében nem is a CD8+ T-sejtek eltérő úton történő, vagy eltérő eredetű (donor vs recipiens) APC-k általi aktivációja áll. Végül ismert az is, hogy az Act-mOVA egerekkel mint donorokkal végzett szolid bőrszövet transzplantáció esetén OT-I recipiensek CD8+ T-sejtjei hatékonyan képesek a bevitt bőrszövet kilökődését kiváltani (58). Mindez pedig nyilvánvalóan azt bizonyítja, hogy semmi akadály annak, hogy OT-I CD8+ T-sejtek OVA-s bőrszövet ellen citotoxikusan lépjenek fel.

A fentiek ellenére a jelenség magyarázata azonban nem lehetetlen. A bőr aGvHD Act-mOVA modellben való elmaradásának első oka megítélésünk szerint az lehet, hogy jelentős eltérés van a két modell között a cél antigén, a csirke OVA molekuláris környezetében, kontextusában. A K14-OVA modellben az OVA a PDGF receptorhoz kapcsolt fúziós fehérjeként van jelen, míg az Act-mOVA modellben az MHC-I transzmembrán doménhez párosítva fejeződik ki (58). Ilyen eltérések elsőre talán jelentéktelennek tűnhetnek, ám ilyen apróságokról régóta ismert, hogy jelentősen befolyásolják az antigénprocesszálas és -prezentáció hatékonyságát, illetve ezen keresztül az MHC-kapcsolt antigénpeptidek tényleges, T-sejtek számára való elérhetőségét, hozzáférhetőségét is.

Adott transzplantált szerv, például a bőr elleni, CD8+ T-sejtek által indított kilökődési reakciókban (HvG) egyértelműen nem csak a célantigén mennyisége a meghatározó, vagyis, hogy az OVA antigén kifejeződik-e a bőrben, amiről tudott, hogy erősen kifejeződik, hanem annak MHC-n keresztüli prezentálhatósága, illetve tényleges prezentáltsága is. Nincs okunk feltételezni, hogy ha mindez igaz a szervi kilökődésre (HvG), akkor miért ne lenne igaz az adott szervi GvH (aGvHD) kialakulására is.

Ezt a magyarázatot valószínűsíti az a fontos adalék is, hogy az Act-mOVA donorral végrehajtott szolid bőr transzplantációt követően az OT-I recipensek CD8+ T-sejtjei okozta kilökődés viszonylag lassan, 15-30 nap alatt ment végbe (58). Összehasonlításképpen, ez az idő K5-mOVA transzgenikus állat esetében (keratin 5 promóter irányított membrán kötött OVA kifejeződés) csupán csak 8 nap (184) és még az általánosan alkalmazott, mind MHC-, mind minor antigén-eltérést is mutató modellek esetén is csak 10-15 nap (185). Ez az időbeni eltérés vélhetően a bőrben rendelkezésre álló, az OVA SIINFEKL peptidet ténylegesen prezentáló APC-k kis számának és/vagy csökkent elérhetőségének köszönhető az Act-mOVA állatokban. Mindez felveti annak lehetőségét, hogy saját Act-mOVA modellünkben a kután aGvHD kialakulásának elmaradása esetleg azzal magyarázható, hogy míg a többi szerv esetén a transzplantációt követő 4-5. napon kialakult az aGvHD, addig a bőr esetében ehhez a kisszámú elérhető OVA-prezentáló APC miatt sokkal több időre lett volna szükség. Más szóval: lehetséges, hogy az Act-mOVA modellben egyszerűen nem volt elég idő a bőr tünetek megjelenésére az állatoknak az egyéb, a bőrnél sokkal inkább létfontosságú, és sokkal erőteljesebben károsodó aGvHDs célszervek diszfunkcionalitása okozta pusztulásáig.

Összességében elmondható tehát, hogy míg a K14-OVA modell inkább egy nem letális, kután aGvHD-szerű betegséget okoz, addig az általunk felállított Act-mOVA modell inkább egy gyors lefolyású, agresszív és halálos gasztrointesztinális/ hepatikus/ pulmonális aGvHD-t alakít ki. Az aGvHD ezen két szervi érintettsége emberben mind külön-külön, mind egyszerre is előfordulhat, így a humán aGvHD-ra jellemző folyamatok összehasonlító vizsgálatára a jövőben talán a két modell együttes, egymást kiegészítő alkalmazása lehet a legmegfelelőbb. Fontos megjegyezni, hogy némi módosítással modellünk alkalmas lehet a crossprezentáció, illetve akár a GvL hatás vizsgálatára is (186).

Mindazonáltal kár tagadni, hogy a modell tisztasága és kísérletes egyszerűsége nem csak előny, de gyenge pont is egyben, lévén azáltal, hogy csak egyetlen minor antigén okozta CD8⁺ T-sejt aktivitás vizsgálatát teszi lehetővé, sosem lesz képes a humán aGvHD-ra jellemző teljes komplexitást reprodukálni (116). Eredményeink alapján úgy gondoljuk ugyanakkor, hogy ez az egyszerű, robosztus, jól reprodukálható aGvHD modell a jövőben lehetőséget nyújt a különböző szervekben elhelyezkedő, illetve oda bevándorló CD8⁺ T-sejtek szövetspecifikus követésére, visszanyerésére, és fenotipizálására az aGvHD folyamata során, és így lehetővé teszi a betegség mechanizmusának mélyebb megértését. Eredményeink szerint a különböző szervekből visszanyert miHA-specifikus CD8⁺ T-sejtek microarray vizsgálata során a vékonybél esetében azok a gének, amelyek a gyors klonális expanzióhoz szükségesek, kevésbé intenzíven íródtak át, mint az aGvHD bármely más célszervében (**25B Ábra**, sárga keret), amely arra utal, hogy a modell valóban alkalmas lehet különböző szervi T-sejtek összehasonlító fenotipizálására. Azonban a modell a kérdés részletes feltárására önmagában nem lesz alkalmas; a kérdés elemzése még további, részletesebb vizsgálatokat, és feltehetően a K14-OVA modell beszerzését fogja igényelni.

Összegezve elmondható, hogy sikerült felállítanunk, illetve validálnunk egy olyan új aGvHD egérmodellt, amely a már ismert K14-OVA modell kiegészítő rendszere és a bőr kivételével bármely más aGvHD-val érintett szerv, kiemelten a bél, CD8⁺ T-sejtjeinek fenotipizálására és aGvHD-ban betöltött szerepének vizsgálatára alkalmas rendszer.

6.2 A CD8⁺ T-sejtek homing markereinek vizsgálata humán mintákon, aGvHDs betegekben

A PhD munkám második részében a Dél-Pesti Centrumkórház Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet, Hematológiai és Össejt-transzplantációs Osztályával együttműködésben humán betegek perifériális vérmintáit vizsgáltuk, egy átfogó, hipotézismentes, genomi génexpressziós vizsgálat segítségével. A hipotézismentes vizsgálattal arra a kérdésre kerestük a választ, hogy léteznek-e olyan, eddig ismeretlen markerek, melyek egy adott, meghatározott szervbe vándorló CD8⁺ T-sejt szubpopulációhoz köthetők, tehát amelyek egy új szervspecifikus homing markerként definiálhatók a CD8⁺ T-sejteken.

Vizsgálataink során az adott szervi homing program aktiválásának, és az adott szervi GvHD-s manifesztáció T-sejtekre gyakorolt hatásait mint független statisztikai faktorokat tudtuk elemezni, mivel a betegmintákat mind a 4 lehetséges csoportban begyűjtöttük (úgy mint után aGvHD-t mutató betegek, gasztrointesztinális aGvHD-t mutató betegek, után és gasztrointesztinális aGvHD-t egyaránt mutató betegek és az aGvHD-s tüneteket nem mutató, kontroll betegek), és a keringő CD8⁺ T-sejteket is minden betegcsoporton belül, minden lehetséges homing szubpopulációra szortolva elemeztük (bőrbe vándorló (CD8⁺/CLA⁺), bélbe vándorló (CD8⁺/ITGβ7⁺) és egyik előbbi szervbe sem (CD8⁺/CLA⁻/ITGβ7⁻) vándorló T-sejtek).

Jelen dolgozatban egyetlen újonnan felfedezett feltételezhető homing-gén, a peptidáz inhibitor 16 azonosítását, validációját és funkcionális elemzését mutattam be, amely, a CD8⁺ T-sejtek bőrbe vándorló alcsoportjának új homing markerének tűnik. Ez a marker az aGvHD kialakulásától és szervi érintettségétől függetlenül, sőt a GvHD-től is függetlenül a bőrbe vándorló CD8⁺ T-sejteken jelentkező, így elsősorban alap kutatási szempontból fontos, klinikai értelemben kevésbé releváns markernek tekinthető. Végző soron így a PI16 esetében az aGvHD inkább, mint egy megfelelő modellrendszer hasznosult, amely egy időben tette lehetővé a különböző szervekbe vándorló CD8⁺ T-sejtek vizsgálatát. A PI16 aGvHD független expressziója nem tette lehetővé klinikai markerként való azonosítását, így diagnosztikus vagy prognosztikus értéke sem volt bizonyítható. A vizsgálatok során ezért az elemzések jelentős része nem is az aGvHDs betegekben, hanem egészséges humán donorok mintáin történt.

A PI16 fehérjével kapcsolatos eredményeink diszkussziója számos komplex kérdést vet fel. A PI16 először PSPBP (prostate secretory protein of 94 amino acids binding protein) néven vált ismertté, mint a prosztatára által termelt fehérje, amely nagy affinitással kötődik a PSP94-hez, és mint a prosztaták egy lehetséges szérums markere, mint szolubilis fehérje került leírásra (172). Ezt követően igazolták a gyanút, hogy expresszióját számos más sejt is végzi, majd szekvencia-homológia alapján a CAP szupercsaládba (cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins) lett besorolva (187). A CAP szupercsalád egy igen szerteágazó, igen heterogén és nagyszámú fehérjét felölelő család, melyben minden tag tartalmaz egy igen konzervált, invariábilis, jellegzetes ún. CAP domént. A szupercsaládban a CAP domén mellett a fehérjékbe beépülő számos egyéb variábilis domén jelenléte vagy hiánya hozza létre a csoport heterogenitását, vagyis a szupercsalád tagjainak igen változatos biológiai funkcióiért elsősorban ez utóbbi, a CAP-tól független, variábilis domének a felelősek.

A CAP szuperfamília tagjai által kifejtett funkciók ezzel összhangban igen sokfélék. A teljesség igénye nélkül például ilyen funkciók a mátrix reorganizáció, a szignalizáció, a fertilizáció avagy az immunmoduláció is, de számos egyéb feladatuk is felvetődött már. A szuperfamília nagy rejtélye azonban maga a konzervált, invariábilis CAP domén, melynek funkciója még máig feltáratlan, és inkább csak spekulációkkal, mint biztos ismeretekkel rendelkezünk róla (188). A CAP domén funkciójának ismeretlensége a PI16 szempontjából különösen fontos, mivel a PI16 a család egyetlen olyan tagja, mely szerkezetét tekintve csak egyetlen CAP doménből és egy igen hosszú, valószínűleg nem organizált kapocs régióból épül fel, mely nem mutat hasonlóságot semmilyen más ismert funkciójú fehérje doménnel. Azaz a PI16 esetében semmilyen további szerkezetből adódó támpontunk nincs a biológiai funkciói tekintetében, sem az ismeretlen funkciójú CAP domén, sem az organizálatlan kapocs régió nem segíti a funkció meghatározását. Az egyetlen dolog, amit a PI16 szerkezetéről még tudtunk az az volt, hogy a szekvencia C terminális végén hidrofób aminosavakat találunk, azonban a korábbi véleményekkel szemben az újabb álláspont az, hogy ezek nem alkotnak bizonyított intramembránt vagy domént (187). A kapocs régió szekvenálását követően először csak gyanították (172), majd egérben bizonyították a PI16 lehetséges GPI horgonyzásának jelenlétét (174). Emberben azonban ez a lehetőség eddig még nem került leírásra, nemhogy független

megegerősítésre, így munkám kezdetén sem a humán PI16 intracelluláris lokalizációja, sem a biológiai membránokhoz való viszonya nem volt egyértelmű.

Vizsgálataink során tehát mi bizonyítottuk elsőként humán mintákon, hogy a PI16 a humán bőrbe vándorló CLA+/CD8+ T-sejtek jellegzetessége, mely elsődlegesen azok plazmamembránjában lokalizálódik, mégpedig GPI horgonyzás segítségével, és megjelenése az aGvHD szervi érintettségétől, az a GvHD-tól, sőt még az aHSCT-től is független, azaz egy meglepően általános, a bőr-hominghoz igen erősen asszociált, eddig ismeretlen markerről van szó. Munkánk során a PI16 szerény irodalma is bővült.

A korábbi megfigyelés, hogy a PI16 expressziója olyan regulatórikus T-sejteken (Treg) is megfigyelhető, melyek CCR4-et fejeznek ki, (173) összecseng saját eredményünkkel. Bár a közlemény diszkussziója (173) jórészt elsiklik e tény felett, a Treg sejteken a CCR4 szintén egy általános, nem naiv T-sejt bőrbe vándorlási homing marker és e sejtek a bőrbe jórészt a CCR4-CCL17 kapcsolaton keresztül juthatnak, amely elsősorban gyulladásos körülmények között releváns (189-191).

Egy másik, a PI16 valamilyen bőr-immunitással való társulását emellett is valószínűsítő közlemény szerint a PI16 génben azonosított egyik gén polimorfizmus krónikus bőrgyulladásra hajlamosít (192). Saját megfigyeléseinkből, és ezekből a független irodalmi adatokból kiindulva érdekesnek ítéltük a PI16 további elemzését.

Ennek során bizonyításra került, hogy a PI16 expressziója a T-sejtek kizárólagossága, és más CLA+ sejteken, például NK-sejteken vagy monocitákon nem jelenik meg, vagyis egy a T-sejtek számára fontos, vagy azokra korlátozódó funkcióról lehet szó. Emellett azt is megfigyeltük, hogy a PI16 expressziója inkább a nyugvó, nem citotoxikus, memóriaszerű cirkuláló CD45RO+/CD8+ T-sejtek jellemzője, mint a nemrég aktiválódott granzim B+ és CD69+ effektor, vagy a naiv, antigénnel még nem találkozott T-sejteké. Érdekes egybeesés, hogy összevetve az egészséges mintákat a betegek mintáin kapott expressziós eredményekkel, az egészséges mintákban a PI16 sokkal nagyobb expressziós szintet mutat, mint a különböző aGvHD tüneteket mutató betegek esetén, melyek közül a legalacsonyabb érték a kután aGvHD esetén alakult ki. Ez az eltérés talán azzal magyarázható, hogy az egészséges személyek vérében sokkal kevesebb aktivált bőrbe vándorló CD8+ T-sejt található, mint az aGvHD-val érintett betegek esetén, illetve

a különböző szervi manifesztációjú aGvHD-k közül a kután aGvHD során alakul ki a legtöbb aktivált bőr irányú homingot mutató effektor CD8⁺ T-sejt.

A PI16 kapcsán kíváncsiak voltunk arra is, hogy vajon mi szabályozhatja ennek a fehérjének a megjelenését illetve eltűnését a bőrbe vándorlásra programozott, a vérben keringő CD8⁺ T-sejtek felszínén. Egyrészt azt tapasztaltuk, hogy a PI16 megjelenése feltehetően független bármilyen eddig ismert DC-indukálta illetve szervi, epitheliális eredetű homing programozó szignáltól, azonban ezen túlmenően megjelenésének pontos okát nem sikerül azonosítanunk. Másrészt egyértelműen bizonyítottuk azt is, hogy a PI16 sejtfelszíni fennmaradása a bőrbe vándorló, nyugvó CD8⁺ T-sejten addig tart, amíg az reaktiválódik, és effektor CD8⁺ T-sejtté nem érik. Az effektor T-sejteken ez a marker ugyanis nemigen fejeződik ki, illetve indukált effektor T-sejtekről pár óra alatt eltűnik. Kimutattuk azt is, hogy a PI16 plazmamembránról való eltűnésének mechanizmusa nem a fehérje GPI horgonyának az elemészése által kiváltott leválasztás (shedding), de nem is a fehérje internalizációja, hanem PI16 gyors transzkripcionális leszabályozása. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy talán a PI16 nem azért tűnik el a reaktivált CD8⁺ T-sejtek felszínéről, hogy a környezetbe kibocsátva, vagy a sejt belsejébe visszahívva valamilyen feladatot lásson el, hanem inkább azt, hogy a funkciója/funkciói talán nem érdekesek, vagy károsak a CD8⁺ T-sejtek reaktivációja és effektorsejtté érése után. Ezek a következtetések persze spekulatívak, ezért is próbáltunk a következő lépésben a fehérje funkciójának meghatározásában is előbbre lépni.

A PI16 funkciója tekintetében a szekvenálási homológia adatok már sokak számára arra engedtek következtetni, hogy a PI16 egy peptidáz inhibitor. Ezzel összhangban, egy-egy megfigyelés szerint a PI16 képes volt lecsökkenteni a katepszin K (174) és MMP-2, többek között a bőrben is kifejeződő gyulladásos proteázok aktivitását (180). Ez a kétféle inhibitor aktivitás eddig csupán egy-egy csoport által, illetve egér szívizomsejteken és humán szív-endothéliumon került leírásra, de átfogó, független csoportok általi, humán vizsgálatok még nem álltak rendelkezésre. Érdekesnek ítéltük, hogy mind az MMP-2, mind a katepszin K, a PI16 két lehetséges célpontja hatással vannak a bőrszövet homeosztázis szabályozására. Az MMP-2 egy extracelluláris proteáz, melynek megváltozott aktivitása komoly elváltozásokhoz vezet a bőrben. Az MMP2 képes a jelző ligandumok és az adhézións molekulák sokaságának elérhetőségét és aktivitását is megváltoztatni, melyek fontos szerepet játszanak a bőr integritásának fenntartásában és a

helyi gyulladás szabályozásában (193). Ezzel szemben a katepszin K, mely lehet lisozómális enzim vagy szekretált extracelluláris proteáz, képes a kollagén és elasztin emésztésére, mely összefügg a bőrgyulladással, a mátrix reorganizációval és a hegek kialakulásával (194).

Az általunk elvégzett vizsgálatok alátámasztották az egér kísérletekből származó eredményeket, miszerint a PI16 a humán CD8⁺ T-sejtek esetén is a katepszin K részleges inhibitoraként hat a nanomoláris tartományban. A mi kezünkben azonban a rekombináns PI16 képtelen volt az MMP-2 gátlására, mely ellentétben áll mások megfigyelésével, így a PI16 MMP-2-re gyakorolt hatása további vizsgálatot igényel. Az eltérés lehet kísérletes hiba, de akár a két kísérletben használt rekombináns fehérjék eltérő forrásai is, ami akár térszerkezeti, akár glikolizáltságbeli eltéréseket válthat ki, és magyarázhatja ezt az eltérést.

Összefoglalva ezek alapján elmondható, hogy a PI16 expressziója a bőrbe vándorló CD8⁺/CLA⁺, nem naiv T-sejtek jellegzetessége, ám kifejeződése nem teljes, a bőrbe vándorló T-sejt alkategóriákon belül változatos, és főleg a nyugvó sejtekre jellemző. A PI16 expressziója ezeken a sejteken, egészséges bőrben, a bőr nyugalmi, steady state állapotában, *in situ* is bizonyosan fennmarad. Adataink arra utalnak, hogy ezt a helyzetet csak a bőrben lévő CD8⁺ T-sejtek újraaktiválódása változtathatja meg, ami feltehetően egy T-sejt válasz során, azaz gyulladásos környezetben, megszünteti egy gyulladásos proteáznak, a katepszin K-nak a gátlását.

Mindez számos érdekes spekulációra ad lehetőséget a CD8⁺ T-sejtek bőrben betöltött funkciójának tekintetében, mint például annak a kérdésnek a felvetését, hogy a gyulladásos válaszokban aktiválódó T-sejtek vajon felfüggeszthetik a gyulladásos folyamathoz szükséges proteázok gátlását, azaz befolyásolhatják-e a lokális mátrix remodellingjét. Mint azt a bevezetőben láttuk, a CD8⁺ T-sejtek effektorfunkcióiról mind többet tudunk, és mind nyilvánvalóbb, hogy azok nem kizárólag a citotoxikus sejtpusztításra korlátozódnak. Azonban e kérdés egyértelmű tisztázásához további vizsgálatokra, a PI16 pontosabb megismerésére, s ehhez pedig mindenekelőtt a fehérje egyetlen meglévő funkcionális doménjének, a rejtélyes, és gyakorlatilag teljesen ismeretlen CAP doménnek a megismerésére lesz szükség.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink alapján az alábbi következtetéseket vontuk le:

Munkánk első felében sikeresen állítottunk fel és validáltunk egy olyan új egér aGvHD modellt, amely a klinikumhoz közeli körülményeket és a betegekben lejárászó aGvHD folyamatokat minél jobban reprodukálni képes, robosztus, a transzplantációt követő 4-7. napon belül, 100%-ban letális aGvHD-t vált ki.

A modell alapját a kereskedelembe is kapható C57BL/6 OT-I (donor) és a C57BL/6 Act-mOVA (recipiens) törzsek adták, amelyek MHC szinten azonos, azonban egyetlen, pontosan ismert minor antigén (OVA, SIINFEKL peptid) tekintetében különböztek egymástól, így a klinikumban a teljes HLA egyezés mellett végrehajtott MUD aHSCT egy speciális modelljét alkotják. A CD8⁺ T-sejtek aktivitása a rendszerben homogén, antigén-specifitása uniform, és ezért a modell experimentálisan könnyen vizsgálható, immunológiailag tiszta rendszert alkot. Modellünk egy már ismert K14-OVA modell kiegészítő rendszere és a bőr kivételével bármely más aGvHD-val érintett szerv (bél, máj, tüdő) CD8⁺ T-sejtjeinek fenotipizálására, összehasonlító vizsgálatára és az aGvHD-ban betöltött szerepének elemzésére alkalmas rendszer, így a jövőben talán a két modell együttes, egymást kiegészítő alkalmazása lehet a legmegfelelőbb. Némi módosítással modellünk alkalmas lehet a crossprezentáció, illetve akár a GvL hatás vizsgálatára is.

Munkánk második felében hipotézismentes vizsgálattal, az aGvHD-t, mint modell rendszert felhasználva, mely egyidőben tette lehetővé a különböző szervekbe vándorló CD8⁺ T-sejtek vizsgálatát, elsőként sikerült azonosítanunk és validálnunk humán mintákon, hogy a PI16 a humán bőrbe vándorló CLA⁺/CD8⁺ nem naiv T-sejtek jellegzetessége, ám kifejeződése nem teljes, a bőrbe vándorló T-sejt alkategóriákon belül változatos, és főleg a nyugvó sejtekre jellemző.

A PI16 expressziója ezeknek a sejteknek a plazmamembránjában lokalizálódik, mégpedig GPI horgonyzással és egészséges bőrben, a bőr nyugalmi, steady state állapotában, *in situ* is fennmarad. Adataink arra utalnak, hogy ezt a helyzetet csak a bőrben lévő CD8⁺ T-sejtek újraaktiválódása változtathatja meg, ami feltehetően egy T-sejt válasz során, azaz gyulladásos környezetben, megszünteti egy gyulladásos proteáznak, a katepszin K-nak a gátlását.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

PhD munkám során az aGvHD különböző célszerveibe bevándorolni készülő, illetve az azokba már bevándorolt, citotoxikusan aktív, és így az adott szervi aGVHD-ban kulcsszerepet játszó, szövetkárosító CD8⁺ T-sejtek összehasonlító karakterizálásával foglalkoztam, hogy a CD8⁺ T-sejtek új, eddig még ismeretlen, potenciálisan klinikailag is releváns biomarkereit azonosítsam. A kutatómunkát mind egér experimentális aGvHD modellben, mind aGvHD-s betegek humán klinikai mintáin végeztem, így az eredmények két egymáshoz kapcsolódó, de metodikailag független kutatásból származnak.

A munka első felében sikeresen állítottunk be és validáltunk egy új, TCR-módosított, egyetlen miHA antigénre reagáló, egér experimentális aGvHD modellt, mely a klinikumhoz közeli körülményeket és a betegekben lejátszódó aGvHD folyamatokat igen jól reprodukálni képes. Az általunk létrehozott modellrendszer egy hatékony, komplementer kiegészítése lehet egy másik, szintén egyetlen miHA mismatch-en alapuló, szintén TCR módosított aGvHD modellnek (K14-OVA), mely kizárólag a bőrben okoz aGvHD-t. Szemben a K14-OVA-moddellel ugyanis, saját modellünk a bőr kivételével rendkívül jól prezentálja egy gyors lefolyású, agresszív és halálos gasztrointesztinális/hepatikus/ pulmonális aGvHD kialakulását. A modell lehetőséget nyújt a különböző szervekben elhelyezkedő, illetve oda bevándorló CD8⁺ T-sejtek szövetspecifikus követésére, visszanyerésére, és fenotipizálására az aGvHD folyamata során, és így lehetővé teszi a betegség mechanizmusának mélyebb megértését, illetve némi módosítással alkalmas a crossprezentáció, illetve akár a GvL hatás vizsgálatára is.

A kutatómunkám második fele már a humán aGvHD-s páciensek mintáinak hipotézismentes kutatására fókuszált, akikben a CD8⁺ T-sejtek homing csoportjai között leginkább eltérő módon kifejezett gének azonosítására tettünk kísérletet. A dolgozat ennek a vizsgálatnak egyetlen ebben a kontextusban még nem ismert, és javarészt ismeretlen PI16 gén validálását és funkcionális elemzését mutatja be. Megállapítottuk, hogy a PI16, mely az aGvHD kialakulástól függetlenül a bőrbe vándorló CD8⁺ T-sejteken expresszáldott, alapkutatási szempontból fontos új, bőr irányú homing biomarkere a CD8⁺ T-sejteknek, azonban klinikai értéke feltehetően csekély, lévén nem kapcsolódik egyik aGVHDs szervi manifesztáció kialakulásához sem.

9. SUMMARY

This PhD thesis focuses on the characterization of CD8 + T cells subsets playing prominent roles in the induction of organ damage during aGvHD. In aGVHD, CD8+ T cells home to distinct target organs affected by the disease depending on the expression of different homing biomarkers, and exert their cytotoxic activity in a tissue-restricted manner. The aim of this project was to identify new, so far unknown biomarkers of aGvHD by comparing the activity of different homing CD8+ T cell subsets, and test whether they could be of any clinical relevance. The research was carried out by using a mouse experimental aGvHD model, and by analyzing human samples of aGvHD patients. That is, the results of my thesis come from two related, but methodically independent research programs.

In the first part of my thesis, we managed to set up and successfully validate a new, TCR-modified, single miHA mismatch-based mouse experimental aGvHD model. The model recapitulates some clinical aHSCT conditions that its alternatives usually do not, and reproduces the pathology of aGvHD occurring in human patients, too. Our model is a system complementary to a known, single miHA mismatch-based aGvHD model (K14-OVA), that, however, can develop cutaneous aGvHD only. In contrast to the K14-OVA system, our model delivers a rapid lethal gastrointestinal / hepatic / pulmonary aGvHD with the exception of the skin involvement. The model provides an opportunity for tissue-specific tracking, recovery and phenotyping of CD8 + T cells homing to, or establishing residence in the target organs during aGvHD, thus enabling a deeper understanding of the mechanism of the disease. Furthermore, with some modifications, our system is suitable to investigate cross-presentation or even GvL effect as well.

In the second part of my thesis I performed a hypothesis-free investigation of human aGvHD samples in order to identify genes that are most differentially expressed in distinct homing subsets of CD8 + T cells. This dissertation presents the validation and functional analysis of only one gene (PI16) that is not yet known in this context. We found that PI16 is over-expressed on non-naïve, resting memory-like CD8+ T cells homing to the skin, and confirmed that it is a novel, disease-independent skin-homing biomarker of this cytotoxic T cell population. This finding is important from a basic research point of view, but its clinical value is probably small, as it is not related to any aGvHD manifestations.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Batai A, Remenyi P, Reti M, Barta A, Gopcsa L, Lengyel L, Torbagyi E, Csukly Z, Karaszi E, Tordai A, Andrikovics H, Balassa K, Tasnady S, Masszi T. (2017) [Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in Hungary]. *Orv Hetil*, 158: 291-7.
2. Henig I, Zuckerman T. (2014) Hematopoietic stem cell transplantation-50 years of evolution and future perspectives. *Rambam Maimonides Med J*, 5: e0028.
3. Niederwieser D, Baldomero H, Szer J, Gratwohl M, Aljurf M, Atsuta Y, Bouzas LF, Confer D, Greinix H, Horowitz M, Iida M, Lipton J, Mohty M, Novitzky N, Nunez J, Passweg J, Pasquini MC, Kodaera Y, Apperley J, Seber A, Gratwohl A. (2016) Hematopoietic stem cell transplantation activity worldwide in 2012 and a SWOT analysis of the Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation Group including the global survey. *Bone Marrow Transplant*, 51: 778-85.
4. Cutler C, Antin JH. (2001) Peripheral blood stem cells for allogeneic transplantation: a review. *Stem Cells*, 19: 108-17.
5. Weaver CH, Buckner CD, Longin K, Appelbaum FR, Rowley S, Lilleby K, Miser J, Storb R, Hansen JA, Bensinger W. (1993) Syngeneic transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after the administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, 82: 1981-4.
6. <2013 Summary Slides- Final Web Version V2 4.14.2014.pdf>.
7. Pidala J, Kim J, Schell M, Lee SJ, Hillgruber R, Nye V, Ayala E, Alsina M, Betts B, Bookout R, Fernandez HF, Field T, Locke FL, Nishihori T, Ochoa JL, Perez L, Perkins J, Shapiro J, Tate C, Tomblyn M, Anasetti C. (2013) Race/ethnicity affects the probability of finding an HLA-A, -B, -C and -DRB1 allele-matched unrelated donor and likelihood of subsequent transplant utilization. *Bone Marrow Transplant*, 48: 346-50.
8. <Vérképző összejelek a gyógyításban_magyar_tudomany_2004-03_337-343.pdf>.
9. Kusnierz-Glaz CR, Schlegel PG, Wong RM, Schriber JR, Chao NJ, Amylon MD, Hu WW, Negrin RS, Lee Y, Blume KG, Long GD. (1997) Influence of age on the outcome of 500 autologous bone marrow transplant procedures for hematologic malignancies. *J Clin Oncol*, 15: 18-25.
10. Miller CB, Piantadosi S, Vogelsang GB, Marcellus DC, Grochow L, Kennedy MJ, Jones RJ. (1996) Impact of age on outcome of patients with cancer undergoing autologous bone marrow transplant. *J Clin Oncol*, 14: 1327-32.
11. Bensinger W, Appelbaum F, Rowley S, Storb R, Sanders J, Lilleby K, Gooley T, Demirev T, Schiffman K, Weaver C, et al. (1995) Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells. *J Clin Oncol*, 13: 2547-55.
12. Friedberg JW, Neuberg D, Stone RM, Alyea E, Jallow H, LaCasce A, Mauch PM, Gribben JG, Ritz J, Nadler LM, Soiffer RJ, Freedman AS. (1999) Outcome in patients with myelodysplastic syndrome after autologous bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, 17: 3128-35.
13. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, et al. (1990) Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*, 75: 555-62.
14. <Hematopoietic Stem Cell Transplantation_ Practice Essentials, Overview, Indications for HSCT.pdf>.
15. Thomas ED, Lochte HL, Jr., Lu WC, Ferrebee JW. (1957) Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*, 257: 491-6.

16. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P, Duarte RF, Dufour C, Kuball J, Farge-Bancel D, Gennery A, Kroger N, Lanza F, Nagler A, Sureda A, Mohty M. (2016) Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant*, 51: 786-92.
17. Erlich H. (2012) HLA DNA typing: past, present, and future. *Tissue Antigens*, 80: 1-11.
18. Park M, Seo JJ. (2012) Role of HLA in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Bone Marrow Res*, 2012: 680841.
19. Petersdorf EW, Gooley TA, Anasetti C, Martin PJ, Smith AG, Mickelson EM, Woolfrey AE, Hansen JA. (1998) Optimizing outcome after unrelated marrow transplantation by comprehensive matching of HLA class I and II alleles in the donor and recipient. *Blood*, 92: 3515-20.
20. Morishima Y, Sasazuki T, Inoko H, Juji T, Akaza T, Yamamoto K, Ishikawa Y, Kato S, Sao H, Sakamaki H, Kawa K, Hamajima N, Asano S, Koda Y. (2002) The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors. *Blood*, 99: 4200-6.
21. Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz M, Hurley C, Kollman C, Anasetti C, Noreen H, Begovich A, Hildebrand W, Petersdorf E, Schmeckpeper B, Setterholm M, Trachtenberg E, Williams T, Yunis E, Weisdorf D. (2004) Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood*, 104: 1923-30.
22. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, Fernandez-Vina M, Flomenberg N, Horowitz M, Hurley CK, Noreen H, Oudshoorn M, Petersdorf E, Setterholm M, Spellman S, Weisdorf D, Williams TM, Anasetti C. (2007) High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood*, 110: 4576-83.
23. Park M, Koh KN, Kim BE, Im HJ, Park KD, Kang HJ, Shin HY, Ahn HS, Yoo KH, Sung KW, Koo HH, Park HJ, Park BK, Seo JJ. (2011) The impact of HLA matching on unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation in Korean children. *Korean J Hematol*, 46: 11-7.
24. Ballen KK, King RJ, Chitphakdithai P, Bolan CD, Jr., Agura E, Hartzman RJ, Kernan NA. (2008) The national marrow donor program 20 years of unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 14: 2-7.
25. Ciurea SO, de Lima M, Cano P, Korbling M, Giral S, Shpall EJ, Wang X, Thall PF, Champlin RE, Fernandez-Vina M. (2009) High risk of graft failure in patients with anti-HLA antibodies undergoing haploidentical stem-cell transplantation. *Transplantation*, 88: 1019-24.
26. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giral S, Lazarus H, Ho V, Apperley J, Slavin S, Pasquini M, Sandmaier BM, Barrett J, Blaise D, Lowsky R, Horowitz M. (2009) Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant*, 15: 1628-33.
27. Kelemen E, Jakab K, Varadi G, Janossa M, Foldi J, Denes R. (1993) Non-supralethal mitobronitol/cytarabine/cyclophosphamide conditioning without irradiation before bone marrow transplantation for accelerated chronic granulocytic leukemia: apparent absence of acute graft-versus-host disease. *Leukemia*, 7: 939-45.

28. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, Heim M, Wilmanns W. (1990) Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*, 76: 2462-5.
29. Elmaagacli AH, Beelen DW, Trenn G, Schmidt O, Nahler M, Schaefer UW. (1999) Induction of a graft-versus-leukemia reaction by cyclosporin A withdrawal as immunotherapy for leukemia relapsing after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 23: 771-7.
30. Wherry EJ. (2011) T cell exhaustion. *Nat Immunol*, 12: 492-9.
31. Claret EJ, Alyea EP, Orsini E, Pickett CC, Collins H, Wang Y, Neuberg D, Soiffer RJ, Ritz J. (1997) Characterization of T cell repertoire in patients with graft-versus-leukemia after donor lymphocyte infusion. *J Clin Invest*, 100: 855-66.
32. Kolb HJ. (2008) Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*, 112: 4371-83.
33. Deol A, Lum LG. (2010) Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological malignancies after stem cell transplantation revisited. *Cancer Treat Rev*, 36: 528-38.
34. Majhail NS, Rizzo JD. (2013) Surviving the cure: long term followup of hematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*, 48: 1145-51.
35. Abdul Wahid SF, Ismail NA, Mohd-Idris MR, Jamaluddin FW, Tumian N, Sze-Wei EY, Muhammad N, Nai ML. (2014) Comparison of reduced-intensity and myeloablative conditioning regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Stem Cells Dev*, 23: 2535-52.
36. Mikulska M, Raiola AM, Signori A, Furfaro E, Del Bono V, Bacigalupo A, Viscoli C. (2013) Screening with serum galactomannan might be associated with better outcome than symptom-triggered galactomannan testing in allogeneic HSCT recipients with invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*, 57: 1786-7.
37. Gratwohl A, Hermans J, Apperley J, Arcese W, Bacigalupo A, Bandini G, di Bartolomeo P, Boogaerts M, Bosi A, Carreras E, et al. (1995) Acute graft-versus-host disease: grade and outcome in patients with chronic myelogenous leukemia. Working Party Chronic Leukemia of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*, 86: 813-8.
38. Ringden O, Labopin M, Beelen DW, Volin L, Ehninger G, Finke J, Greinix HT, Kyrz-Krzemien S, Bunjes D, Brinch L, Niederwieser D, Arnold R, Mohty M, Rocha V, Acute Leukaemia Working Party of European Group for B, Marrow T. (2012) Bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation from unrelated donors in adult patients with acute myeloid leukaemia, an Acute Leukaemia Working Party analysis in 2262 patients. *J Intern Med*, 272: 472-83.
39. Pollyea DA, Artz AS, Stock W, Daugherty C, Godley L, Odenike OM, Rich E, Smith SM, Zimmerman T, Zhang Y, Huo D, Larson R, van Besien K. (2007) Outcomes of patients with AML and MDS who relapse or progress after reduced intensity allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 40: 1027-32.
40. Spyridonidis A, Labopin M, Schmid C, Volin L, Yakoub-Agha I, Stadler M, Milpied N, Socie G, Browne P, Lenhoff S, Sanz MA, Aljurf M, Mohty M, Rocha V, Immunotherapy Subcommittee of Acute Leukemia Working P. (2012) Outcomes and prognostic factors of adults with acute lymphoblastic leukemia who relapse after allogeneic hematopoietic cell transplantation. An analysis on behalf of the Acute Leukemia Working Party of EBMT. *Leukemia*, 26: 1211-7.

41. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, Wingard JR, Young JA, Boeckh MJ, Center for International B, Marrow R, National Marrow Donor p, European B, MarrowTransplant G, American Society of B, Marrow T, Canadian B, Marrow Transplant G, Infectious Diseases Society of A, Society for Healthcare Epidemiology of A, Association of Medical M, Infectious Disease C, Centers for Disease C, Prevention. (2009) Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant*, 15: 1143-238.
42. Billingham RE. (1966) The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect*, 62: 21-78.
43. Jagasia M, Arora M, Flowers ME, Chao NJ, McCarthy PL, Cutler CS, Urbano-Ispizua A, Pavletic SZ, Haagenson MD, Zhang MJ, Antin JH, Bolwell BJ, Bredeson C, Cahn JY, Cairo M, Gale RP, Gupta V, Lee SJ, Litzow M, Weisdorf DJ, Horowitz MM, Hahn T. (2012) Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 119: 296-307.
44. Khoury HJ, Wang T, Hemmer MT, Couriel D, Alousi A, Cutler C, Aljurf M, Antin JH, Ayas M, Battiwalla M, Cahn JY, Cairo M, Chen YB, Gale RP, Hashmi S, Hayashi RJ, Jagasia M, Juckett M, Kamble RT, Kharfan-Dabaja M, Litzow M, Majhail N, Miller A, Nishihori T, Qayed M, Schoemans H, Schouten HC, Socie G, Storek J, Verdonck L, Vij R, Wood WA, Yu L, Martino R, Carabasi M, Dandoy C, Gergis U, Hematti P, Solh M, Jamani K, Lehmann L, Savani B, Schultz KR, Wirk BM, Spellman S, Arora M, Pidala J. (2017) Improved survival after acute graft-versus-host disease diagnosis in the modern era. *Haematologica*, 102: 958-66.
45. Krenger W, Hollander GA. (2008) The thymus in GVHD pathophysiology. *Best Pract Res Clin Haematol*, 21: 119-28.
46. Martin PJ, Lee SJ, Przepiorka D, Horowitz MM, Koreth J, Vogelsang GB, Walker I, Carpenter PA, Griffith LM, Akpek G, Mohty M, Wolff D, Pavletic SZ, Cutler CS. (2015) National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: VI. The 2014 Clinical Trial Design Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant*, 21: 1343-59.
47. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED. (1974) Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*, 18: 295-304.
48. Ball LM, Egeler RM, Party EPW. (2008) Acute GvHD: pathogenesis and classification. *Bone Marrow Transplant*, 41 Suppl 2: S58-64.
49. Shlomchik WD. (2007) Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol*, 7: 340-52.
50. Teshima T, Reddy P, Zeiser R. (2016) Acute Graft-versus-Host Disease: Novel Biological Insights. *Biol Blood Marrow Transplant*, 22: 11-6.
51. Johansson JE, Brune M, Ekman T. (2001) The gut mucosa barrier is preserved during allogeneic, haemopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant*, 28: 737-42.
52. Chen Y, Zhao Y, Cheng Q, Wu D, Liu H. (2015) The Role of Intestinal Microbiota in Acute Graft-versus-Host Disease. *J Immunol Res*, 2015: 145859.
53. Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. (2012) Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nature reviews Immunology*, 12: 443-58.
54. Paczesny S, Hanauer D, Sun Y, Reddy P. (2010) New perspectives on the biology of acute GVHD. *Bone Marrow Transplant*, 45: 1-11.

55. Wang H, Yang YG. (2014) The complex and central role of interferon-gamma in graft-versus-host disease and graft-versus-tumor activity. *Immunol Rev*, 258: 30-44.
56. Ghayur T, Seemayer TA, Kongshavn PA, Gartner JG, Lapp WS. (1987) Graft-versus-host reactions in the beige mouse. An investigation of the role of host and donor natural killer cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Transplantation*, 44: 261-7.
57. Tanaka M, Kobayashi S, Numata A, Tachibana T, Takasaki H, Maruta A, Ishigatsubo Y, Kanamori H. (2012) The impact of the dose of natural killer cells in the graft on severe acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. *Leuk Res*, 36: 699-703.
58. Ehst BD, Ingulli E, Jenkins MK. (2003) Development of a novel transgenic mouse for the study of interactions between CD4 and CD8 T cells during graft rejection. *Am J Transplant*, 3: 1355-62.
59. Lee SE, Cho BS, Kim JH, Yoon JH, Shin SH, Yahng SA, Eom KS, Kim YJ, Kim HJ, Lee S, Min CK, Cho SG, Kim DW, Lee JW, Min WS, Park CW. (2013) Risk and prognostic factors for acute GVHD based on NIH consensus criteria. *Bone Marrow Transplant*, 48: 587-92.
60. Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W, Flowers ME, Maloney DG, Sandmaier BM, Maris MB, Storb R. (2003) Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 102: 756-62.
61. Al-Kadhimi Z, Gul Z, Rodriguez R, Chen W, Smith D, Mitchell A, Abidi M, Ayash L, Deol A, Lum L, Forman S, Ratanatharathorn V, Uberti J. (2012) Anti-thymocyte globulin (thymoglobulin), tacrolimus, and sirolimus as acute graft-versus-host disease prophylaxis for unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 18: 1734-44.
62. Finke J, Bethge WA, Schmoor C, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR, Volin L, Ruutu T, Heim DA, Schwerdtfeger R, Kolbe K, Mayer J, Maertens JA, Linkesch W, Holler E, Koza V, Bornhauser M, Einsele H, Kolb HJ, Bertz H, Egger M, Grishina O, Socie G, Group AT-FT. (2009) Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 10: 855-64.
63. Randolph SS, Gooley TA, Warren EH, Appelbaum FR, Riddell SR. (2004) Female donors contribute to a selective graft-versus-leukemia effect in male recipients of HLA-matched, related hematopoietic stem cell transplants. *Blood*, 103: 347-52.
64. Gahrton G, Iacobelli S, Apperley J, Bandini G, Bjorkstrand B, Blade J, Boiron JM, Cavo M, Cornelissen J, Corradini P, Kroger N, Ljungman P, Michallet M, Russell NH, Samson D, Schattenberg A, Sirohi B, Verdonck LF, Volin L, Zander A, Niederwieser D. (2005) The impact of donor gender on outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma: reduced relapse risk in female to male transplants. *Bone Marrow Transplant*, 35: 609-17.
65. Loren AW, Bunin GR, Boudreau C, Champlin RE, Cnaan A, Horowitz MM, Loberiza FR, Porter DL. (2006) Impact of donor and recipient sex and parity on outcomes of HLA-identical sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 12: 758-69.
66. Kim HT, Zhang MJ, Woolfrey AE, St Martin A, Chen J, Saber W, Perales MA, Armand P, Eapen M. (2016) Donor and recipient sex in allogeneic stem cell transplantation: what really matters. *Haematologica*, 101: 1260-6.

67. Sorror ML, Martin PJ, Storb RF, Bhatia S, Maziarz RT, Pulsipher MA, Maris MB, Davis C, Deeg HJ, Lee SJ, Maloney DG, Sandmaier BM, Appelbaum FR, Gooley TA. (2014) Pretransplant comorbidities predict severity of acute graft-versus-host disease and subsequent mortality. *Blood*, 124: 287-95.
68. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, Thomas ED. (1995) 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant*, 15: 825-8.
69. MacMillan ML, Robin M, Harris AC, DeFor TE, Martin PJ, Alousi A, Ho VT, Bolanos-Meade J, Ferrara JL, Jones R, Arora M, Blazar BR, Holtan SG, Jacobsohn D, Pasquini M, Socie G, Antin JH, Levine JE, Weisdorf DJ. (2015) A refined risk score for acute graft-versus-host disease that predicts response to initial therapy, survival, and transplant-related mortality. *Biol Blood Marrow Transplant*, 21: 761-7.
70. Rowlings PA, Przepiorka D, Klein JP, Gale RP, Passweg JR, Henslee-Downey PJ, Cahn JY, Calderwood S, Gratwohl A, Socie G, Abecasis MM, Sobocinski KA, Zhang MJ, Horowitz MM. (1997) IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade. *Br J Haematol*, 97: 855-64.
71. Levine JE, Braun TM, Harris AC, Holler E, Taylor A, Miller H, Magenau J, Weisdorf DJ, Ho VT, Bolanos-Meade J, Alousi AM, Ferrara JL, Blood, Marrow Transplant Clinical Trials N. (2015) A prognostic score for acute graft-versus-host disease based on biomarkers: a multicentre study. *Lancet Haematol*, 2: e21-9.
72. Cahn JY, Klein JP, Lee SJ, Milpied N, Blaise D, Antin JH, Leblond V, Ifrah N, Jouet JP, Loberiza F, Ringden O, Barrett AJ, Horowitz MM, Socie G, Societe Francaise de Greffe de Moelle et Therapie C, Dana Farber Cancer I, International Bone Marrow Transplant R. (2005) Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Societe Francaise de Greffe de Moelle et Therapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. *Blood*, 106: 1495-500.
73. Paczesny S, Krijanovski OI, Braun TM, Choi SW, Clouthier SG, Kuick R, Misek DE, Cooke KR, Kitko CL, Weyand A, Bickley D, Jones D, Whitfield J, Reddy P, Levine JE, Hanash SM, Ferrara JL. (2009) A biomarker panel for acute graft-versus-host disease. *Blood*, 113: 273-8.
74. McDonald GB, Tabellini L, Storer BE, Lawler RL, Martin PJ, Hansen JA. (2015) Plasma biomarkers of acute GVHD and nonrelapse mortality: predictive value of measurements before GVHD onset and treatment. *Blood*, 126: 113-20.
75. Nassereddine S, Rafei H, Elbahesh E, Tabbara I. (2017) Acute Graft Versus Host Disease: A Comprehensive Review. *Anticancer Res*, 37: 1547-55.
76. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, Buckner CD, Clift R, Doney K, Farewell V, et al. (1986) Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Engl J Med*, 314: 729-35.
77. Chao NJ, Schmidt GM, Niland JC, Amylon MD, Dagis AC, Long GD, Nademanee AP, Negrin RS, O'Donnell MR, Parker PM, et al. (1993) Cyclosporine, methotrexate, and prednisone compared with cyclosporine and prednisone for prophylaxis of acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med*, 329: 1225-30.
78. Chen GL, Zhang Y, Hahn T, Abrams S, Ross M, Liu H, McCarthy PL. (2014) Acute GVHD prophylaxis with standard-dose, micro-dose or no MTX after fludarabine/melphalan conditioning. *Bone Marrow Transplant*, 49: 248-53.

79. Hamilton BK, Rybicki L, Dean R, Majhail NS, Haddad H, Abounader D, Hanna R, Sobecks R, Duong H, Hill BT, Copelan E, Bolwell B, Kalaycio M. (2015) Cyclosporine in combination with mycophenolate mofetil versus methotrexate for graft versus host disease prevention in myeloablative HLA-identical sibling donor allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Am J Hematol*, 90: 144-8.
80. Levine JE. (2011) Implications of TNF-alpha in the pathogenesis and management of GVHD. *Int J Hematol*, 93: 571-7.
81. Ferrara JL. (1995) Cytokine inhibitors and graft-versus-host disease. *Ann N Y Acad Sci*, 770: 227-36.
82. Zeiser R, Blazar BR. (2017) Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. *N Engl J Med*, 377: 2167-79.
83. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O. (2004) Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*, 363: 1439-41.
84. Furlong T, Storb R, Anasetti C, Appelbaum FR, Deeg HJ, Doney K, Martin P, Sullivan K, Witherspoon R, Nash RA. (2000) Clinical outcome after conversion to FK 506 (tacrolimus) therapy for acute graft-versus-host disease resistant to cyclosporine or for cyclosporine-associated toxicities. *Bone Marrow Transplant*, 26: 985-91.
85. Mielcarek M, Storer BE, Boeckh M, Carpenter PA, McDonald GB, Deeg HJ, Nash RA, Flowers ME, Doney K, Lee S, Marr KA, Furlong T, Storb R, Appelbaum FR, Martin PJ. (2009) Initial therapy of acute graft-versus-host disease with low-dose prednisone does not compromise patient outcomes. *Blood*, 113: 2888-94.
86. Cragg L, Blazar BR, Defor T, Kolatker N, Miller W, Kersey J, Ramsay M, McGlave P, Filipovich A, Weisdorf D. (2000) A randomized trial comparing prednisone with antithymocyte globulin/prednisone as an initial systemic therapy for moderately severe acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 6: 441-7.
87. Xhaard A, Rocha V, Bueno B, de Latour RP, Lenglet J, Petropoulou A, Rodriguez-Otero P, Ribaud P, Porcher R, Socie G, Robin M. (2012) Steroid-refractory acute GVHD: lack of long-term improved survival using new generation anticytokine treatment. *Biol Blood Marrow Transplant*, 18: 406-13.
88. Jamil MO, Mineishi S. (2015) State-of-the-art acute and chronic GVHD treatment. *Int J Hematol*, 101: 452-66.
89. Reddy P, Ferrara JL. (2003) Immunobiology of acute graft-versus-host disease. *Blood Rev*, 17: 187-94.
90. Busca A, Locatelli F, Marmont F, Ceretto C, Falda M. (2007) Recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor fusion protein as treatment for steroid refractory graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Hematol*, 82: 45-52.
91. Hale G. (2001) The CD52 antigen and development of the CAMPATH antibodies. *Cytotherapy*, 3: 137-43.
92. Dignan FL, Clark A, Amrolia P, Cornish J, Jackson G, Mahendra P, Scarisbrick JJ, Taylor PC, Hadzic N, Shaw BE, Potter MN, Haemato-oncology Task Force of British Committee for Standards in H, British Society for B, Marrow T. (2012) Diagnosis and management of acute graft-versus-host disease. *British journal of haematology*, 158: 30-45.
93. Garnett C, Apperley JF, Pavlu J. (2013) Treatment and management of graft-versus-host disease: improving response and survival. *Ther Adv Hematol*, 4: 366-78.

94. Pende D, Marcenaro S, Falco M, Martini S, Bernardo ME, Montagna D, Romeo E, Cognet C, Martinetti M, Maccario R, Mingari MC, Vivier E, Moretta L, Locatelli F, Moretta A. (2009) Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood*, 113: 3119-29.
95. Rosenblatt J, Vasir B, Uhl L, Blotta S, Macnamara C, Somaiya P, Wu Z, Joyce R, Levine JD, Dombagoda D, Yuan YE, Francoeur K, Fitzgerald D, Richardson P, Weller E, Anderson K, Kufe D, Munshi N, Avigan D. (2011) Vaccination with dendritic cell/tumor fusion cells results in cellular and humoral antitumor immune responses in patients with multiple myeloma. *Blood*, 117: 393-402.
96. Rezvani K. (2011) Posttransplantation vaccination: concepts today and on the horizon. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011: 299-304.
97. Ho VT, Vanneman M, Kim H, Sasada T, Kang YJ, Pasek M, Cutler C, Koreth J, Alyea E, Sarantopoulos S, Antin JH, Ritz J, Canning C, Kutok J, Mihm MC, Dranoff G, Soiffer R. (2009) Biologic activity of irradiated, autologous, GM-CSF-secreting leukemia cell vaccines early after allogeneic stem cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 15825-30.
98. Burkhardt UE, Hainz U, Stevenson K, Goldstein NR, Pasek M, Naito M, Wu D, Ho VT, Alonso A, Hammond NN, Wong J, Sievers QL, Brusic A, McDonough SM, Zeng W, Perrin A, Brown JR, Canning CM, Koreth J, Cutler C, Armand P, Neuberg D, Lee JS, Antin JH, Mulligan RC, Sasada T, Ritz J, Soiffer RJ, Dranoff G, Alyea EP, Wu CJ. (2013) Autologous CLL cell vaccination early after transplant induces leukemia-specific T cells. *J Clin Invest*, 123: 3756-65.
99. Kwak LW, Taub DD, Duffey PL, Bensinger WI, Bryant EM, Reynolds CW, Longo DL. (1995) Transfer of myeloma idiotype-specific immunity from an actively immunised marrow donor. *Lancet*, 345: 1016-20.
100. Neelapu SS, Munshi NC, Jagannath S, Watson TM, Pennington R, Reynolds C, Barlogie B, Kwak LW. (2005) Tumor antigen immunization of sibling stem cell transplant donors in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant*, 36: 315-23.
101. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Kell J, Freeman S, Kjeldsen L, Hunter AE, Yin J, Craddock CF, Dufva IH, Wheatley K, Milligan D. (2012) Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy improves survival in older patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 30: 3924-31.
102. Topp MS, Gokbuget N, Zugmaier G, Degenhard E, Goebeler ME, Klinger M, Neumann SA, Horst HA, Raff T, Viardot A, Stelljes M, Schaich M, Kohne-Volland R, Bruggemann M, Ottmann OG, Burmeister T, Baeuerle PA, Nagorsen D, Schmidt M, Einsele H, Riethmuller G, Kneba M, Hoelzer D, Kufer P, Bargou RC. (2012) Long-term follow-up of hematologic relapse-free survival in a phase 2 study of blinatumomab in patients with MRD in B-lineage ALL. *Blood*, 120: 5185-7.
103. Arndt C, von Bonin M, Cartellieri M, Feldmann A, Koristka S, Michalk I, Stamova S, Bornhauser M, Schmitz M, Ehninger G, Bachmann M. (2013) Redirection of T cells with a first fully humanized bispecific CD33-CD3 antibody efficiently eliminates AML blasts without harming hematopoietic stem cells. *Leukemia*, 27: 964-7.
104. von Bubnoff N, Ihorst G, Grishina O, Rothling N, Bertz H, Duyster J, Finke J, Zeiser R. (2018) Ruxolitinib in GvHD (RIG) study: a multicenter, randomized phase 2 trial to determine the response rate of Ruxolitinib and best available treatment (BAT)

- versus BAT in steroid-refractory acute graft-versus-host disease (aGvHD) (NCT02396628). *BMC Cancer*, 18: 1132.
105. Yucebay F, Matthews C, Puto M, Li J, William B, Jaglowski SM, Penza SL, Vasu S, Benson DM, Andritsos LA, Devine SM, Efebera YA, Roddy JVF. (2019) Tocilizumab as first-line therapy for steroid-refractory acute graft-versus-host-disease: analysis of a single-center experience. *Leuk Lymphoma*, 1-7.
 106. <Begelomab.pdf>.
 107. Gasiorowski RE, Clark GJ, Bradstock K, Hart DN. (2014) Antibody therapy for acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 164: 481-95.
 108. Pastore D, Delia M, Mestice A, Carluccio P, Perrone T, Gaudio F, Curci P, Rossi AR, Ricco A, Specchia G. (2012) CD3+/Tregs ratio in donor grafts is linked to acute graft-versus-host disease and immunologic recovery after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 18: 887-93.
 109. Sadelain M, Brentjens R, Riviere I. (2013) The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov*, 3: 388-98.
 110. Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, Dudley ME, Stetler-Stevenson M, Feldman SA, Maric I, Raffeld M, Nathan DA, Lanier BJ, Morgan RA, Rosenberg SA. (2010) Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood*, 116: 4099-102.
 111. Mardiros A, Brown CE, Budde LE, Wang X, Forman SJ. (2013) Acute myeloid leukemia therapeutics: CARs in the driver's seat. *Oncoimmunology*, 2: e27214.
 112. Korngold R, Sprent J. (1987) T cell subsets and graft-versus-host disease. *Transplantation*, 44: 335-9.
 113. Kernan NA, Collins NH, Juliano L, Cartagena T, Dupont B, O'Reilly RJ. (1986) Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. *Blood*, 68: 770-3.
 114. Petersdorf EW, Malkki M. (2006) Genetics of risk factors for graft-versus-host disease. *Semin Hematol*, 43: 11-23.
 115. Mestas J, Hughes CC. (2004) Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*, 172: 2731-8.
 116. Hulsdunker J, Zeiser R. (2015) Insights into the pathogenesis of GvHD: what mice can teach us about man. *Tissue Antigens*, 85: 2-9.
 117. Riesner K, Kalupa M, Shi Y, Elezkurtaj S, Penack O. (2016) A preclinical acute GVHD mouse model based on chemotherapy conditioning and MHC-matched transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 51: 410-7.
 118. Sprent J, Gao EK, Webb SR. (1990) T cell reactivity to MHC molecules: immunity versus tolerance. *Science*, 248: 1357-63.
 119. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, Shlomchik MJ, Emerson SG. (1999) Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science*, 285: 412-5.
 120. Nikolic B, Lee S, Bronson RT, Grusby MJ, Sykes M. (2000) Th1 and Th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct end-organ targets. *J Clin Invest*, 105: 1289-98.
 121. Schroeder MA, DiPersio JF. (2011) Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Dis Model Mech*, 4: 318-33.

122. Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, Wilson DB. (1988) Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature*, 335: 256-9.
123. Christianson SW, Greiner DL, Hesselton RA, Leif JH, Wagar EJ, Schweitzer IB, Rajan TV, Gott B, Roopenian DC, Shultz LD. (1997) Enhanced human CD4⁺ T cell engraftment in beta2-microglobulin-deficient NOD-scid mice. *J Immunol*, 158: 3578-86.
124. Nervi B, Rettig MP, Ritchey JK, Wang HL, Bauer G, Walker J, Bonyhadi ML, Berenson RJ, Prior JL, Piwnicka-Worms D, Nolta JA, DiPersio JF. (2007) Factors affecting human T cell engraftment, trafficking, and associated xenogeneic graft-vs-host disease in NOD/SCID beta2mnull mice. *Exp Hematol*, 35: 1823-38.
125. Lucas PJ, Shearer GM, Neudorf S, Gress RE. (1990) The human antimurine xenogeneic cytotoxic response. I. Dependence on responder antigen-presenting cells. *J Immunol*, 144: 4548-54.
126. Yu J, Pressoir G, Briggs WH, Vroh Bi I, Yamasaki M, Doebley JF, McMullen MD, Gaut BS, Nielsen DM, Holland JB, Kresovich S, Buckler ES. (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat Genet*, 38: 203-8.
127. Damdinsuren B, Zhang Y, Khalil A, Wood WH, 3rd, Becker KG, Shlomchik MJ, Sen R. (2010) Single round of antigen receptor signaling programs naive B cells to receive T cell help. *Immunity*, 32: 355-66.
128. Wang K, Tang D, Wang M, Lu J, Yu H, Liu J, Qian B, Gong Z, Wang X, Chen J, Gu M, Cheng Z. (2009) MER3 is required for normal meiotic crossover formation, but not for presynaptic alignment in rice. *J Cell Sci*, 122: 2055-63.
129. Shibaki A, Sato A, Vogel JC, Miyagawa F, Katz SI. (2004) Induction of GVHD-like skin disease by passively transferred CD8(+) T-cell receptor transgenic T cells into keratin 14-ovalbumin transgenic mice. *J Invest Dermatol*, 123: 109-15.
130. Ersek B, Lupsa N, Pocza P, Toth A, Horvath A, Molnar V, Bagita B, Bencsik A, Hegyesi H, Matolcsy A, Buzas EI, Pos Z. (2016) Unique patterns of CD8⁺ T-cell-mediated organ damage in the Act-mOVA/OT-I model of acute graft-versus-host disease. *Cell Mol Life Sci*, 73: 3935-47.
131. Nolz JC. (2015) Molecular mechanisms of CD8(+) T cell trafficking and localization. *Cell Mol Life Sci*, 72: 2461-73.
132. Nolz JC, Starbeck-Miller GR, Harty JT. (2011) Naive, effector and memory CD8 T-cell trafficking: parallels and distinctions. *Immunotherapy*, 3: 1223-33.
133. Lagarrigue F, Kim C, Ginsberg MH. (2016) The Rap1-RIAM-talin axis of integrin activation and blood cell function. *Blood*, 128: 479-87.
134. Sheridan BS, Lefrancois L. (2011) Regional and mucosal memory T cells. *Nat Immunol*, 12: 485-91.
135. Agace WW. (2008) T-cell recruitment to the intestinal mucosa. *Trends Immunol*, 29: 514-22.
136. Teijaro JR, Turner D, Pham Q, Wherry EJ, Lefrancois L, Farber DL. (2011) Cutting edge: Tissue-retentive lung memory CD4 T cells mediate optimal protection to respiratory virus infection. *J Immunol*, 187: 5510-4.
137. <review-skin-and-the-immune-system-2155-9554.S2-003.pdf>.
138. Kunkel EJ, Boisvert J, Murphy K, Vierra MA, Genovese MC, Wardlaw AJ, Greenberg HB, Hodge MR, Wu L, Butcher EC, Campbell JJ. (2002) Expression of the

- chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes. *Am J Pathol*, 160: 347-55.
139. Fu Y, Yang J, Xiong N. (2016) Cutting Edge: Skin CCR10+ CD8+ T Cells Support Resident Regulatory T Cells through the B7.2/Receptor Axis To Regulate Local Immune Homeostasis and Response. *J Immunol*, 196: 4859-64.
 140. Hudak S, Hagen M, Liu Y, Catron D, Oldham E, McEvoy LM, Bowman EP. (2002) Immune surveillance and effector functions of CCR10(+) skin homing T cells. *J Immunol*, 169: 1189-96.
 141. Agace WW. (2006) Tissue-tropic effector T cells: generation and targeting opportunities. *Nat Rev Immunol*, 6: 682-92.
 142. Feagan BG, Greenberg GR, Wild G, Fedorak RN, Pare P, McDonald JW, Dube R, Cohen A, Steinhart AH, Landau S, Aguzzi RA, Fox IH, Vandervoort MK. (2005) Treatment of ulcerative colitis with a humanized antibody to the alpha4beta7 integrin. *N Engl J Med*, 352: 2499-507.
 143. Kuklin NA, Rott L, Darling J, Campbell JJ, Franco M, Feng N, Muller W, Wagner N, Altman J, Butcher EC, Greenberg HB. (2000) alpha(4)beta(7) independent pathway for CD8(+) T cell-mediated intestinal immunity to rotavirus. *J Clin Invest*, 106: 1541-52.
 144. Svensson M, Marsal J, Ericsson A, Carramolino L, Broden T, Marquez G, Agace WW. (2002) CCL25 mediates the localization of recently activated CD8alphabeta(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa. *J Clin Invest*, 110: 1113-21.
 145. Stenstad H, Ericsson A, Johansson-Lindbom B, Svensson M, Marsal J, Mack M, Picarella D, Soler D, Marquez G, Briskin M, Agace WW. (2006) Gut-associated lymphoid tissue-primed CD4+ T cells display CCR9-dependent and -independent homing to the small intestine. *Blood*, 107: 3447-54.
 146. Chen YB, Kim HT, McDonough S, Odze RD, Yao X, Lazo-Kallanian S, Spitzer TR, Soiffer R, Antin JH, Ritz J. (2009) Up-Regulation of alpha4beta7 integrin on peripheral T cell subsets correlates with the development of acute intestinal graft-versus-host disease following allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 15: 1066-76.
 147. Chen YB, McDonough S, Chen H, Kennedy J, Illiano C, Attar EC, Ballen KK, Dey BR, McAfee SL, Jagasia M, Soiffer R, Spitzer TR, Ritz J. (2013) Expression of alpha4beta7 integrin on memory CD8(+) T cells at the presentation of acute intestinal GVHD. *Bone Marrow Transplant*, 48: 598-603.
 148. Reddy P. (2003) Pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Hematol Oncol*, 21: 149-61.
 149. Beilhack A, Schulz S, Baker J, Beilhack GF, Nishimura R, Baker EM, Landan G, Herman EI, Butcher EC, Contag CH, Negrin RS. (2008) Prevention of acute graft-versus-host disease by blocking T-cell entry to secondary lymphoid organs. *Blood*, 111: 2919-28.
 150. Koyama M, Kuns RD, Olver SD, Raffelt NC, Wilson YA, Don AL, Lineburg KE, Cheong M, Robb RJ, Markey KA, Varelias A, Malissen B, Hammerling GJ, Clouston AD, Engwerda CR, Bhat P, MacDonald KP, Hill GR. (2011) Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nat Med*, 18: 135-42.
 151. Matte-Martone C, Liu J, Jain D, McNiff J, Shlomchik WD. (2008) CD8+ but not CD4+ T cells require cognate interactions with target tissues to mediate GVHD across

only minor H antigens, whereas both CD4+ and CD8+ T cells require direct leukemic contact to mediate GVL. *Blood*, 111: 3884-92.

152. Engelhardt BG, Jagasia M, Savani BN, Bratcher NL, Greer JP, Jiang A, Kassim AA, Lu P, Schuening F, Yoder SM, Rock MT, Crowe JE, Jr. (2011) Regulatory T cell expression of CLA or alpha(4)beta(7) and skin or gut acute GVHD outcomes. *Bone Marrow Transplant*, 46: 436-42.

153. Petrovic A, Alpdogan O, Willis LM, Eng JM, Greenberg AS, Kappel BJ, Liu C, Murphy GJ, Heller G, van den Brink MR. (2004) LPAM (alpha 4 beta 7 integrin) is an important homing integrin on alloreactive T cells in the development of intestinal graft-versus-host disease. *Blood*, 103: 1542-7.

154. Waldman E, Lu SX, Hubbard VM, Kochman AA, Eng JM, Terwey TH, Muriglan SJ, Kim TD, Heller G, Murphy GF, Liu C, Alpdogan O, van den Brink MR. (2006) Absence of beta7 integrin results in less graft-versus-host disease because of decreased homing of alloreactive T cells to intestine. *Blood*, 107: 1703-11.

155. Faaij CM, Lankester AC, Spierings E, Hooigeboom M, Bowman EP, Bierings M, Revesz T, Egeler RM, van Tol MJ, Annels NE. (2006) A possible role for CCL27/CTACK-CCR10 interaction in recruiting CD4 T cells to skin in human graft-versus-host disease. *Br J Haematol*, 133: 538-49.

156. Tilg H, Kaser A. (2010) Vedolizumab, a humanized mAb against the alpha4beta7 integrin for the potential treatment of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Curr Opin Investig Drugs*, 11: 1295-304.

157. Stuve O, Marra CM, Jerome KR, Cook L, Cravens PD, Cepok S, Frohman EM, Phillips JT, Arendt G, Hemmer B, Monson NL, Racke MK. (2006) Immune surveillance in multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *Ann Neurol*, 59: 743-7.

158. Walters MJ, Wang Y, Lai N, Baumgart T, Zhao BN, Dairaghi DJ, Bekker P, Ertl LS, Penfold ME, Jaen JC, Keshav S, Wendt E, Pennell A, Ungashe S, Wei Z, Wright JJ, Schall TJ. (2010) Characterization of CCX282-B, an orally bioavailable antagonist of the CCR9 chemokine receptor, for treatment of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Exp Ther*, 335: 61-9.

159. Kong F, Chen CH, Cooper MD. (1998) Thymic function can be accurately monitored by the level of recent T cell emigrants in the circulation. *Immunity*, 8: 97-104.

160. Lynch HE, Sempowski GD. (2013) Molecular measurement of T cell receptor excision circles. *Methods Mol Biol*, 979: 147-59.

161. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, Polis MA, Haase AT, Feinberg MB, Sullivan JL, Jamieson BD, Zack JA, Picker LJ, Koup RA. (1998) Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*, 396: 690-5.

162. Mallone R, Mannering SI, Brooks-Worrell BM, Durinovic-Bello I, Cilio CM, Wong FS, Schloot NC, T-Cell Workshop Committee IoDS. (2011) Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. *Clin Exp Immunol*, 163: 33-49.

163. Huang H, Lu X, Liu Y, Haaland P, Marron JS. (2012) R/DWD: distance-weighted discrimination for classification, visualization and batch adjustment. *Bioinformatics*, 28: 1182-3.

164. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, Van Houdt WJ, Pronk A, Van Gorp J, Siersema PD, Clevers H. (2011) Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*, 141: 1762-72.
165. Yardeni T, Eckhaus M, Morris HD, Huizing M, Hoogstraten-Miller S. (2011) Retro-orbital injections in mice. *Lab animal*, 40: 155-60.
166. Reddy P, Negrin R, Hill GR. (2008) Mouse models of bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 14: 129-35.
167. Tsuchiyama J, Yoshino T, Saito T, Furukawa T, Ito K, Fuse I, Aizawa Y. (2009) Cutaneous lymphocyte antigen-positive T cells may predict the development of acute GVHD: alterations and differences of CLA+ T- and NK-cell fractions. *Bone Marrow Transplant*, 43: 863-73.
168. Mackay LK, Rahimpour A, Ma JZ, Collins N, Stock AT, Hafon ML, Vega-Ramos J, Lauzurica P, Mueller SN, Stefanovic T, Tschärke DC, Heath WR, Inouye M, Carbone FR, Gebhardt T. (2013) The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat Immunol*, 14: 1294-301.
169. Clark RA, Chong B, Mirchandani N, Brinster NK, Yamanaka K, Dowgiert RK, Kupper TS. (2006) The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. *J Immunol*, 176: 4431-9.
170. Gorfu G, Rivera-Nieves J, Ley K. (2009) Role of beta7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Curr Mol Med*, 9: 836-50.
171. Ponten F, Jirstrom K, Uhlen M. (2008) The Human Protein Atlas--a tool for pathology. *J Pathol*, 216: 387-93.
172. Reeves JR, Xuan JW, Arfanis K, Morin C, Garde SV, Ruiz MT, Wisniewski J, Panchal C, Tanner JE. (2005) Identification, purification and characterization of a novel human blood protein with binding affinity for prostate secretory protein of 94 amino acids. *Biochem J*, 385: 105-14.
173. Nicholson IC, Mavrangelos C, Bird DR, Bresatz-Atkins S, Eastaff-Leung NG, Grose RH, Gundsambuu B, Hill D, Millard DJ, Sadlon TJ, To S, Zola H, Barry SC, Krumbiegel D. (2012) PI16 is expressed by a subset of human memory Treg with enhanced migration to CCL17 and CCL20. *Cell Immunol*, 275: 12-8.
174. Regn M, Lagerbauer B, Jentzsch C, Ramanujam D, Ahles A, Sichler S, Calzada-Wack J, Koenen RR, Braun A, Nieswandt B, Engelhardt S. (2016) Peptidase inhibitor 16 is a membrane-tethered regulator of chemerin processing in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 99: 57-64.
175. Sigmundsdottir H, Pan J, Debes GF, Alt C, Habtezion A, Soler D, Butcher EC. (2007) DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat Immunol*, 8: 285-93.
176. Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, Song SY. (2004) Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity*, 21: 527-38.
177. McCully ML, Ladell K, Hakobyan S, Mansel RE, Price DA, Moser B. (2012) Epidermis instructs skin homing receptor expression in human T cells. *Blood*, 120: 4591-8.
178. Kondoh G, Tojo H, Nakatani Y, Komazawa N, Murata C, Yamagata K, Maeda Y, Kinoshita T, Okabe M, Taguchi R, Takeda J. (2005) Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization. *Nat Med*, 11: 160-6.
179. Leisle L, Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM. (2005) Angiotensin-converting enzyme as a GPIase: a critical reevaluation. *Nat Med*, 11: 1139-40.

180. Hazell GG, Peachey AM, Teasdale JE, Sala-Newby GB, Angelini GD, Newby AC, White SJ. (2016) PI16 is a shear stress and inflammation-regulated inhibitor of MMP2. *Sci Rep*, 6: 39553.
181. Wysocki CA, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. (2005) Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood*, 105: 4191-9.
182. Teshima T, Ordemann R, Reddy P, Gagin S, Liu C, Cooke KR, Ferrara JL. (2002) Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat Med*, 8: 575-81.
183. Li M, Davey GM, Sutherland RM, Kurts C, Lew AM, Hirst C, Carbone FR, Heath WR. (2001) Cell-associated ovalbumin is cross-presented much more efficiently than soluble ovalbumin in vivo. *J Immunol*, 166: 6099-103.
184. Azukizawa H, Kosaka H, Sano S, Heath WR, Takahashi I, Gao XH, Sumikawa Y, Okabe M, Yoshikawa K, Itami S. (2003) Induction of T-cell-mediated skin disease specific for antigen transgenically expressed in keratinocytes. *Eur J Immunol*, 33: 1879-88.
185. Pilon CB, Petillon S, Naserian S, Martin GH, Badoual C, Lang P, Azoulay D, Piaggio E, Grimbert P, Cohen JL. (2014) Administration of low doses of IL-2 combined to rapamycin promotes allogeneic skin graft survival in mice. *Am J Transplant*, 14: 2874-82.
186. Koestner W, Hapke M, Herbst J, Klein C, Welte K, Fruehauf J, Flatley A, Vignali DA, Hardtke-Wolenski M, Jaeckel E, Blazar BR, Sauer MG. (2011) PD-L1 blockade effectively restores strong graft-versus-leukemia effects without graft-versus-host disease after delayed adoptive transfer of T-cell receptor gene-engineered allogeneic CD8+ T cells. *Blood*, 117: 1030-41.
187. Gibbs GM, Roelants K, O'Bryan MK. (2008) The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocr Rev*, 29: 865-97.
188. K. Olrichs N, Bernd Helms J. (2016) Novel insights into the function of the conserved domain of the CAP superfamily of proteins. *AIMS Biophysics*, 3: 232-46.
189. Homey B, Alenius H, Muller A, Soto H, Bowman EP, Yuan W, McEvoy L, Lauerma AI, Assmann T, Bunemann E, Lehto M, Wolff H, Yen D, Marxhausen H, To W, Sedgwick J, Ruzicka T, Lehmann P, Zlotnik A. (2002) CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med*, 8: 157-65.
190. Saeki H, Tamaki K. (2006) Thymus and activation regulated chemokine (TARC)/CCL17 and skin diseases. *J Dermatol Sci*, 43: 75-84.
191. Soler D, Humphreys TL, Spinola SM, Campbell JJ. (2003) CCR4 versus CCR10 in human cutaneous TH lymphocyte trafficking. *Blood*, 101: 1677-82.
192. Navarini AA, Simpson MA, Weale M, Knight J, Carlavan I, Reiniche P, Burden DA, Layton A, Bataille V, Allen M, Pleass R, Pink A, Creamer D, English J, Munn S, Walton S, Acne Genetic Study G, Willis C, Deret S, Voegel JJ, Spector T, Smith CH, Trembath RC, Barker JN. (2014) Genome-wide association study identifies three novel susceptibility loci for severe Acne vulgaris. *Nat Commun*, 5: 4020.
193. Bauvois B. (2012) New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim Biophys Acta*, 1825: 29-36.
194. Runger TM, Quintanilla-Dieck MJ, Bhawan J. (2007) Role of cathepsin K in the turnover of the dermal extracellular matrix during scar formation. *J Invest Dermatol*, 127: 293-7.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

11.1 Az értekezéshez felhasznált közlemények listája

- **Lupsa Nikolett**, Érsek Barbara, Horváth Andor, Bencsik András, Lajkó Eszter, Silló Pálma, Oszvald Ádám, Wiener Zoltán, Reményi Péter, Mikala Gábor, Masszi Tamás, Buzás Edit, Pósz Zoltán, Skin-homing CD8+ T cells preferentially express GPI anchored peptidase inhibitor 16, an inhibitor of cathepsin K, European Journal of Immunology, 48: 12 pp. 1944-1957. (2018)

IF: 4,695

- Érsek B¹, **Lupsa N¹**, Pócza P, Tóth A, Horváth A, Molnár V, Bagita B, Bencsik A, Hegyesi H, Matolcsy A, Buzás IE, Pósz Z, Unique patterns of CD8+ T-cell-mediated organ damage in the Act-mOVA/OT-I model of acute graft-versus-host disease, Cellular and Molecular Life Sciences, 73: 20 pp. 3935-3947. (2016)

IF: 5.788

¹ **Megosztott első szerzők**

Értekezéshez felhasznált közlemények kumulatív impakt faktora: **10,036**

Ebből elsőszerzős impakt faktor: **10,036**

11.2 Az értekezéshez fel nem használt közlemények listája

- Wit, J., Sarup, P., **Lupsa, N.**, Malte, H., Frydenberg, J., Loeschke, V. (2013) Longevity for free? Increased reproduction with limited trade-offs in Drosophila melanogaster selected for increased life span, Experimental Gerontology 48: 3 pp. 349-357 (2013)

IF: 3,529

- Királyhidi Panna, Marton Nikolett, Baricza Eszter, Molnár Eszter, Badari Noémi, **Lupsa Nikolett**, Buzás Edit, Nagy György (2018) Egérmodellek a reumatoid arthritisben, Immunológiai Szemle, 10. 4. pp 11-15. (2018)

- **Lupsa Nikolett** (2016) Támadás a befogadó szervezet ellen, Élet és tudomány, 71: 25 pp. 782-783 (2016)

Összes közlemény kumulatív impakt faktora: **14,012**

Ebből elsőszerzős impakt faktor: **10,483**

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Buzás Editnek, a Semmelweis Egyetem, Genetikai, Sejt, és Immunbiológiai Intézet igazgatójának, hogy végig támogatta PhD hallgatói pályafutásomat, a rengeteg ajánlást, amivel pályázataimat segítette és a sok jó ötletet és észrevételt, amivel munkámhoz és megjelenő cikkeimhez hozzájárult.

Köszönöm emellett Prof. Dr. Falus Andrásnak, az SE GSI Intézet korábbi igazgatójának, hogy számos ismeretterjesztő cikk megírására ösztönzött, minden lehetséges módon támogatta pályázataimat és, hogy a PhD szombatok megszervezésével színesítette PhD-s éveimet. Köszönöm neki, hogy előadásaimat, beszámolóimat és PhD munkámat mindig figyelemmel kísérte.

Kiemelten szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Pós Zoltánnak, hogy vállalva a kockázatot első PhD hallgatójának fogadott, megismertette velem az immunológia rejtelseit és színes módszertanát. Az elmúlt évek során minden pályázatomat, hazai és külföldi konferenciákon való szereplésem, tanulmányi útjaimat és ismeretterjesztő publikációimat kimagaslóan segítette. Elviselte igazságérzetem válságait és akár a legextrémebb időpontokban is elérhető volt, hogy számtalan kérdésemet megválaszolja. Köszönöm neki azt a baráti és támogató légkört, amit kutatócsoportjában teremtett és, hogy bármilyen ötletemet megoszthattam vele. Köszönöm, hogy nem zárkózott el a munkaidőn túli tevékenységektől sem, így megteremtve a karácsonyi és egyéb ünnepi vacsorákat és jó hangulatú laser tageket.

Hálás vagyok munkacsoportunk tagjainak: Dr. Molnár-Érsek Barbarának, aki a csoportba kerülésemtől végig segített a módszertan és adatelemzés elsajátításában, Bencsik Andrásnak hogy megosztotta velem hisztológiai és konfokális mikroszkópiai tudását és Badari Noéminek az egér kísérletek és állatgondozás terén nyújtott segítségét. Továbbá hálás vagyok nekik a jókedvű konferenciákért, a közös publikációkért és, hogy barátként gondolhatok rájuk.

Rengeteg köszönettel tartozom az SE GSI Intézet összes dolgozójának, hiszen nincs olyan munkatárs az intézetben, akivel nem dolgoztam volna együtt, vagy akitől nem kaptam volna segítséget. Külön köszönet Dr. Lajkó Eszternek a fluorimetriás mérésekért, Dr. Tóth Sárának a mikroszkópiai segítségért, Dr. Wiener Zoltánnak és Oszvald Ádámnak a bél organoidok rendelkezésemre bocsájtásáért. Továbbá hálás vagyok Dr. Marton

Nikolettnek és Királyhidi Pannának, hogy segítették munkámat, illetve, hogy jó hangulatban teltek a közösen töltött évek.

Hálás vagyok kooperátorainknak:

- A Dél-Pesti Centrumkórház Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet, Hematológiai és Óssejt-transzplantációs Osztály egykori (Dr. Masszi Tamás, Dr. Mikala Gábor) és jelenlegi (Dr. Reményi Péter) vezetőinek, hogy kutatásunkat befogadták és az osztály beteganyagával segítették munkánkat. Az osztály munkatársainak, hogy segítették a minták begyűjtését, kiemelten az adat managereknek Tatai Gábornak és Vuncs Zoltánnak, hogy a mintagyűjtésen túl a vizsgálathoz szükséges betegadatokat is rendelkezésemre bocsájtották.
- A Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika munkatársának, Dr. Silló Pálmának az egészséges bőr biopsziás mintákért és szakmai tanácsaiért.
- Az I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet munkatársainak, kiemelten Dr. Matolcsy Andrásnak, hogy kutatómunkákat az intézetébe befogadta és Dr. Pócza Péternek az egér hisztológiai kísérletekben nyújtott segítségéért.
- Dr. Hegyesi Hargitának az akkor még Országos Közegészségügyi Központ Országos Frédéric Joliot-Curie Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet munkatársának az egérmodell beállításához szükséges kondicionálási kísérletekben nyújtott munkájáért.
- Dr. Matkó Jánosnak az ELTE Immunológiai Tanszék egyetemi tanárának a T-sejt szortolásában és a konfokális mikroszkópban nyújtott segítségéért.

Külön köszönettel tartozom páromnak Vuncs Zoltánnak, aki végig támogatta minden elképzelésem és ötletem, hogy az évek során munkám miatt számtalanszor költözött és, az sem vette el a kedvét, hogy külön országban éljünk. Hálás vagyok végtelen türelméért, megértéséért és azért, hogy ő van nekem.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak, hogy mindig, minden elképzelésem, akár erejükön felül is támogatták, hogy mindig arra ösztönöztek valósítsam meg terveimet és, hogy egy nyugodt szerető családi háttérrel biztosítottak számomra. Köszönöm, hogy a borús időkben mindig felvidítottak és azt, hogy a mai napig mindig mindenben számíthatok rájuk. Úgy érzem, nélkülük nem lennék az, aki vagyok, és nagyon szeretem őket.